

Aus dem Physiologischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Markus Bleich)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Rolle der Phospholipase A<sub>2</sub> und ihrer Metabolite bei  
der Aktivierung des epithelialen Natriumkanals  
durch niedrige Osmolarität in A6 Zellen**

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Anastasia Polyankina

aus Georgiewsk, Russland

Kiel 2016

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. Markus Bleich*

2. Berichterstatter: *Prof. Dr. Edmund Maser*

Tag der mündlichen Prüfung: *8. November 2017*

Zum Druck genehmigt, Kiel, den *28. August 2017*

*gez.: Prof. Dr. Johann Kuhtz-Buschbeck*  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Epithelialer Natriumkanal (ENaC) .....	1
1.2 Hypotonischer Stress und epithelialer Natriumtransport in A6 Zellen .....	2
1.3 Hemmung der Phospholipase A <sub>2</sub> und ihrer Metabolite in A6 Zellen.....	6
1.4 Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC).....	8
1.5 Phospholipase A <sub>2</sub> und ihr Metabolismus .....	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	14
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1 Zellkultur.....	15
2.2 Kontrolllösung.....	16
2.3 Substanzen .....	17
2.4 Ussing-Kammer.....	18
2.4.1 Funktion und Aufbau.....	18
2.4.2 Messprotokoll .....	19
2.4.3 Auswertung und Statistik.....	21
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>22</b>
3.1 Hemmung der Phospholipase A <sub>2</sub> .....	23
3.2 Hemmung der Arachidonat-5-Lipoxygenase .....	26
3.3 Hemmung der Cyclooxygenasen.....	27
3.4 Hemmung der Cytochrom P450 Epoxygenase. ....	30
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>31</b>
4.1 Schlussfolgerung aus den Experimenten. ....	31

---

4.2	Hypothesen zur Rolle von MAP-Kinasen.....	32
4.3	Mögliche Signalwege der Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC) via PLA2 und ihrer Metabolite bei niedriger Osmolalität in unterschiedlichen Zellsystemen .....	34
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>38</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>39</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>45</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>47</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Epithelialer Natriumkanal .....	2
<b>Abb. 2:</b>	Schematische Darstellung einer A6 Zelle mit den Ionenkanälen, Transportern und der $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase .....	3
<b>Abb. 3:</b>	Darstellung der Entstehung der transepithelialen Potentialdifferenz in A6 Zellen ....	4
<b>Abb. 4:</b>	Schematischer Ablauf der Signale, die zu erhöhtem Natriumtransport, ausgelöst durch hypotonischen Stress führen.....	5
<b>Abb. 5:</b>	Modell der A6 Zelle mit den hypothetischen Signalwegen der durch hypotonen Stress ausgelösten Aktivierung von ENaC und den möglichen Angriffsorten für Inhibitoren (siehe Text) der PLA2 und ihrer Metabolite .....	8
<b>Abb. 6:</b>	Arachidonsäure und ihre Metabolite Prostaglandin (PG), Eicosanotriensäure (ET) und Leukotrien (LT) .....	13
<b>Abb. 7:</b>	Ussing-Kammer nach Willy van Driessche .....	19
<b>Abb. 8:</b>	Darstellung des typischen Verlaufes der Spannungsaufzeichnung gegen die Zeit in einem Experiment mit hypotonischem Stress in A6 Zellen.....	20
<b>Abb. 9:</b>	Zellmodell mit den möglichen Angriffsorten für Inhibitoren der PLA2 und der Enzyme, die ihre verschiedenen Metabolite bilden.....	22
<b>Abb. 10:</b>	Wirkung von Quinacrin auf $I_{sc}$ beim hypotonischen Stress in A6-Zellen.....	23
<b>Abb. 11:</b>	Wirkung von Aristolochiasäure auf $I_{sc}$ beim hypotonischen Stress in A6 Zellen .....	24
<b>Abb. 12:</b>	Wirkung von Bromoenol lacton BEL auf $I_{sc}$ beim hypotonischen Stress in A6 Zellen. ....	25
<b>Abb. 13:</b>	Wirkung von NDGA auf $I_{sc}$ beim hypotonischen Stress in A6-Zellen. ....	26
<b>Abb. 14:</b>	Wirkung von Indomethacin auf $I_{sc}$ beim hypotonischen Stress in A6-Zellen. ....	27
<b>Abb. 15:</b>	Wirkung von Resveratrol auf $I_{sc}$ beim hypotonischen Stress in A6-Zellen .....	28
<b>Abb. 16:</b>	Wirkung von Celecoxib auf $I_{sc}$ beim hypotonischen Stress in A6 Zellen.....	29
<b>Abb. 17:</b>	Wirkung von MS-PPOH auf $I_{sc}$ beim hypotonischen Stress in A6 Zellen.....	30
<b>Abb. 18:</b>	Mögliche Signalwege in der Regulation von ENaC beim hypotonischen Stress in der A6-Zelle .....	36

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1:</b>	Zusammensetzung der Kontrolllösung .....	16
<b>Tab. 2:</b>	Zusammensetzung der hypotonen Lösung.....	17

## Abkürzungsverzeichnis

5-HPETE.....	5-Hydroperoxyeicosatetraensäure
5-LO.....	Arachidonat-5-Lipoxygenase
AA .....	Arachidonsäure
ADH.....	Antidiuretisches Hormon (Vasopressin)
BEL.....	Bromoenol lactone
cAMP .....	Cyclisches Adenosinmonophosphat
COX.....	Cyclooxygenase
COX.....	Cyclooxygenase
EGF.....	Epidermaler Wachstumsfaktor
ENaC .....	Epithelialer Natriumkanal
I <sub>sc</sub> .....	Äquivalenter Kurzschlussstrom
IP <sub>3</sub> .....	Inositoltrisphosphat
LT .....	Leukotrien
NDGA.....	Nordihydroguaiaretic acid
PG.....	Prostaglandin
PIP2 .....	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3 .....	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PKA .....	Proteinkinase A
PKC .....	Proteinkinase C
PLA2.....	Phospholipase A2
PLA2.....	PLA2
Rte.....	Transepithelialer Widerstand
RTK .....	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RVD.....	Regulatory Volume Decrease
SGK .....	Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase
TEP .....	Transepitheliales Potential
Vte .....	Transepitheliales elektrisches Potential

# 1 Einleitung

Der Wasser-Elektrolyt-Haushalt des Körpers unterliegt strengen Regulationsmechanismen. Bei der Entgleisung des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes kann es zu unterschiedlichen Krankheiten kommen. Die Volkskrankheit Bluthochdruck dient hier als Beispiel.

Einer der wichtigsten Faktoren für die Aufrechthaltung des Extrazellulärvolumens ist der Natriumgehalt des Körpers. Die Hauptlast für den Ausgleich des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes trägt die Niere. Über 99 % des filtrierten Natriums wird durch die Niere zurückgewonnen. Davon werden etwa 90 % im proximalen Tubulus und im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL) resorbiert. Die verbleibenden 10 % werden im distalen Abschnitt des Nephrons zurück gewonnen (1).

Die Bilanzierung des Wasserhaushaltes im Körper wird über Hormone (z.B. ADH, Aldosteron) gesteuert, die Transportmechanismen der Niere steuern.

## 1.1 Epithelialer Natriumkanal (ENaC)

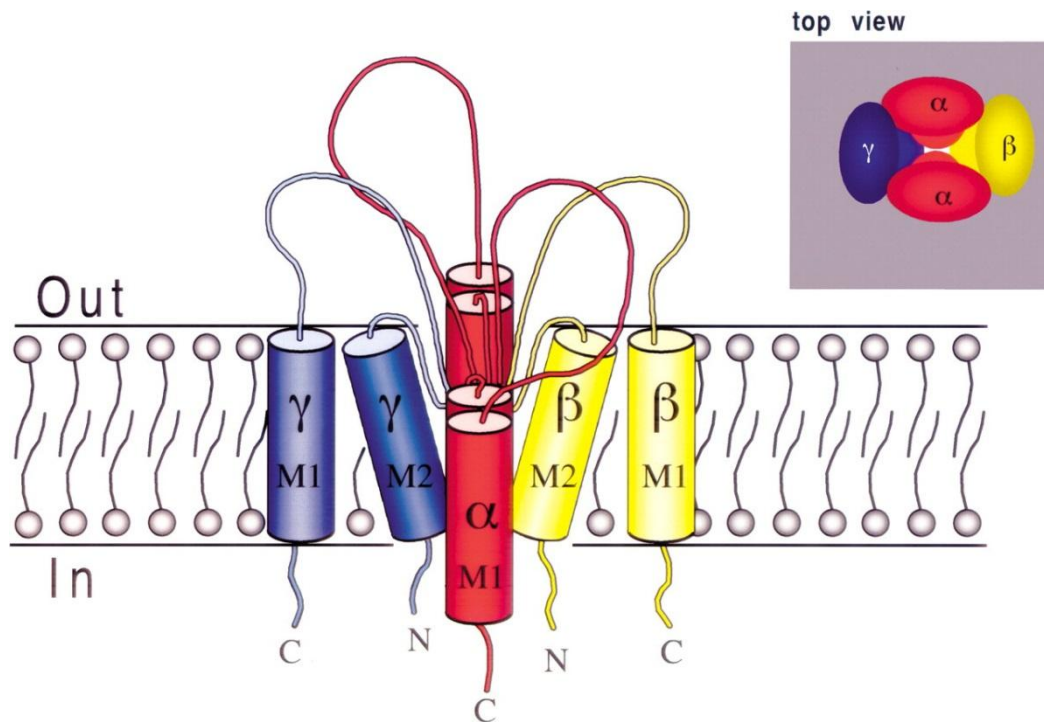
Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) kommt im Aldosteron-sensiblen distalen Nephron (ASDN) vor. Dieses besteht aus dem distalen Teil der Pars convoluta des distalen Tubulus, dem Verbindungsstück sowie dem kortikalen und medullären Abschnitt des Sammelrohrs. ENaC wird über unterschiedliche regulatorische Systeme gesteuert und ist Angriffspunkt für Pharmaka wie Amilorid und Benzamil (2;3).

ENaC wird auch in anderen Organen wie dem Kolon, den Schweiß- und Speicheldrüsen und der Lunge exprimiert (4).

ENaC besteht aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -ENaC), die in bis zu 30% ihrer Proteinzusammensetzung identisch sind. ENaC ist wahrscheinlich ein Heterotetramer (5). Jede Untereinheit hat 2 Transmembranhelices mit kurzen Amino- und Carboxytermini der Polypeptidketten und eine lange extrazelluläre Schleife (4).

Abbildung 1 zeigt ein Modell der Untereinheiten von ENaC als Tetramer in der Zellmembran.





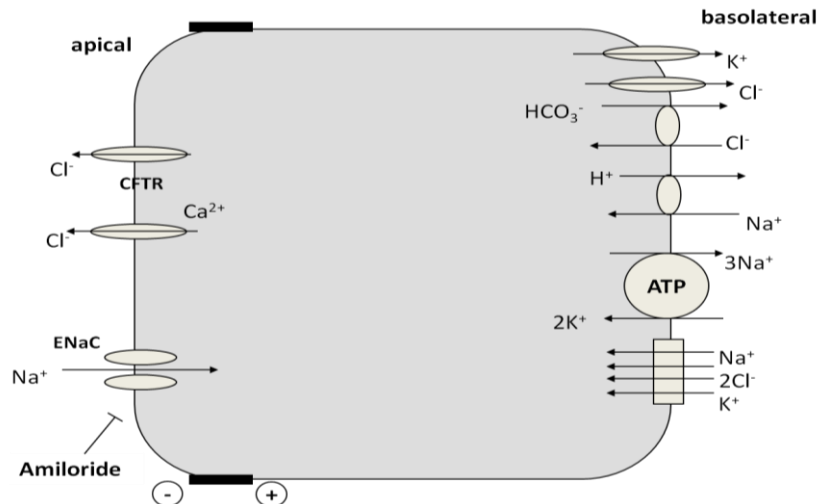
**Abb. 1:** Epithelialer Natriumkanal [Grafik aus (5) unverändert]. N und C bezeichnen die jeweiligen Amino- und Carboxyenden der Aminosäureketten auf der Zellinnenseite (*In*). Die lipophilen Transmembransegmente sind als Zylinder dargestellt. Die dem Epithellumen zugewandte Seite ist mit *Out* bezeichnet. Die Aufsicht (top view) zeigt die Anordnung der Untereinheiten als Tetramer.

Unterschiedliche Signalwege regulieren ENaC und damit die Leitfähigkeit der luminalen Zellmembran für Natrium. Hierzu gehören die Phosphorylierung oder partielle Proteolyse, die Steuerung der Anzahl der Kanäle durch Expression und Membraneinbau bzw. die Ubiquitinierung, Endocytose und der Abbau der Proteine im Lysosom (6).

## 1.2 Hypotonischer Stress und epithelialer Natriumtransport in A6 Zellen

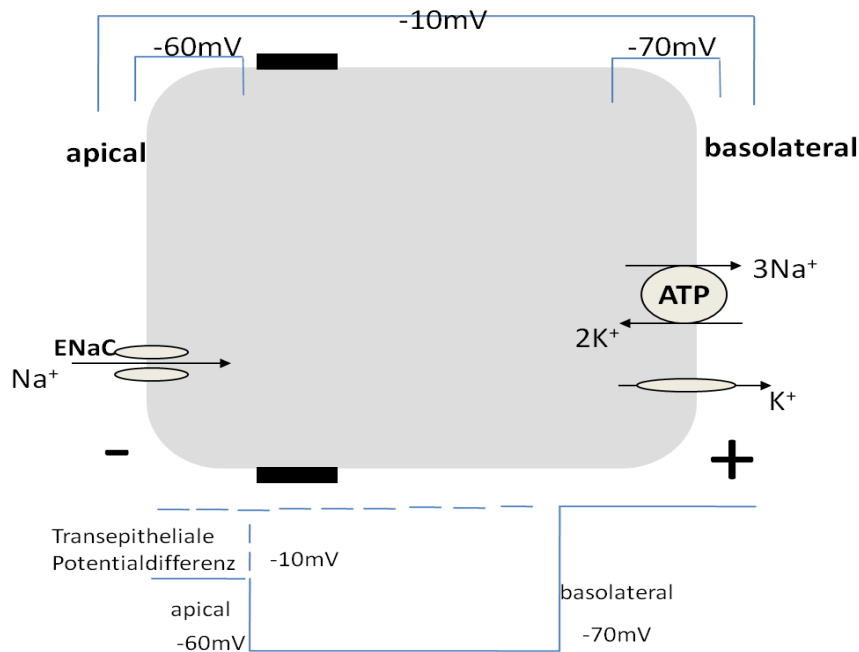
A6 Zellen wurden ursprünglich aus dem distalen Nephron des Krallenfrosches isoliert und als permanente Zellkultur etabliert (7). A6 Zellen dienen als einfaches Modell für Natrium resorbierende Epithelzellen (8).

A6 Zellen besitzen am apikalen Zellpol ENaC und zwei Typen Chloridionenkanäle, darunter Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) (3;9). Am basolateralen Zellpol werden die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (3), Kalium- und Chloridionenkanäle (1),  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter (9), Natrium-Protonen-Austauscher (10) und  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher exprimiert (11). Die Abbildung 2 zeigt ein Modell der A6 Zelle.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung einer A6 Zelle mit den Ionenkanälen, Transportern und der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. Chloridkanäle und ENaC sind apikal exprimiert. Am basolateralen Zellpol findet man die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase(3), Kalium- und Chloridionenkanäle, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-Cotransporter(9), Natrium-Protonen-Austauscher und Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher. Im Zellverband kann sich durch Natriumresorption über ENaC ein apikal negatives (-) transepitheliales Potential aufbauen, das bei Hemmung des Kanals durch Amilorid zusammenbricht.

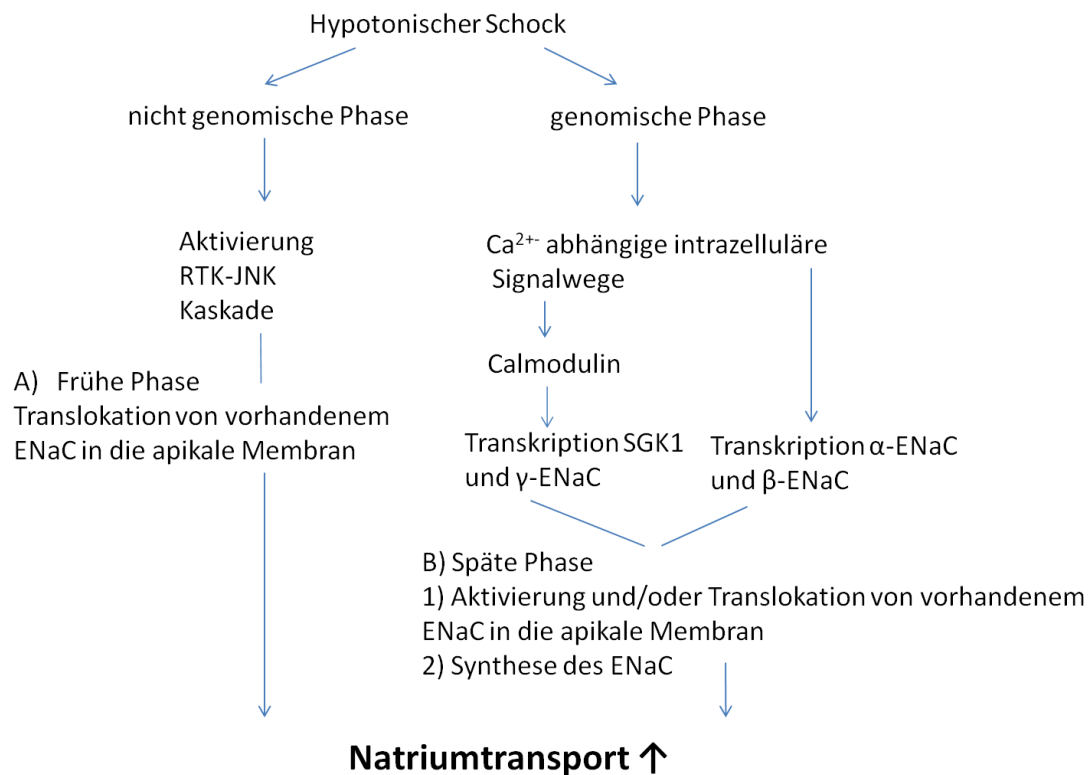
Der epitheliale Natriumtransport in A6 Zellen ist elektrogen (12). Da das Zytosol im Vergleich zum Lumen negativer geladen ist und die Natriumkonzentration im Zytosol niedriger ist als im Lumen, entsteht ein, in das Zellinnere gerichteter Natrium-Gradient. Das in das Zellinnere einströmende Natrium depolarisiert die luminale Membran (-60 mV) im Vergleich zur basolateralen Membran (-70 mV) (13). Das basolaterale Membranpotential ist durch die K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit und den aktiven Natriumtransport mit Hilfe der Natrium-Kalium-Pumpe bedingt (7). So entsteht eine transepitheliale Potentialdifferenz (V<sub>te</sub>) von -10 mV (Abbildung 3). Voraussetzung für die Bildung einer solchen Potentialdifferenz ist ein dichter Zellverband, in dem die Zellen durch Tight Junctions so untereinander verbunden sind, dass sich insgesamt ein transepithelialer Widerstand (R<sub>te</sub>) bildet. Über diesen Widerstand baut sich die elektrische Spannung auf. Der zugehörige Strom wird als äquivalenter Kurzschlussstrom I<sub>sc</sub> bezeichnet. Nach dem Ohm'schen Gesetz gilt:  $V_{te} = R_{te} \cdot I_{sc}$ . Würde das Epithel durch Wegfall dieses Widerstandes elektrisch kurzgeschlossen, dann würde der elektrogene Transport als tatsächlicher Kurzschlussstrom (I<sub>sc</sub>) fließen. Weiter bilden die Tight Junctions eine Barriere für die laterale Bewegung der Membranproteine und ermöglichen so ihre polare Verteilung.



**Abb. 3:** Darstellung der Entstehung der transepithelialen Potentialdifferenz in A6 Zellen. Zur Vereinfachung sind nur noch die dafür relevanten Ionenkanäle und die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase eingezeichnet. Die Tight Junctions (TJ) dichten das Epithel zur jeweiligen Nachbarzelle ab und sind Teil der elektrischen Abdichtung zwischen apikaler und basolateraler Seite.

Wenn die Zelle basolateral einer niedrigen Osmolalität ausgesetzt ist, greifen unterschiedliche regulatorische Mechanismen zur Erhaltung der Homöostase und Bewahrung der Zelle vor dem Zelltod. Zuerst strömt Wasser in die Zelle hinein und die Zelle schwillt an (14). Durch die Zellschwellung werden kompensatorische Mechanismen eingeschaltet. Dazu gehört die Verminderung der intrazellulären Konzentration von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$ , wodurch die Zellen wieder schrumpfen. Dieser Prozess heißt „Regulatory Volume Decrease“ (RVD) (15). Dieser Vorgang verläuft schnell (16). Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass eine niedrige basolaterale Osmolalität eine Steigerung der ENaC-Anzahl in der apikalen Membran bewirkt. (1;17). Diese Aktivierung des  $\text{Na}^+$ -Transportes ist langsam und dauert ca. 120 min (18). Der Aktivierung von ENaC beim hypotonischen Stress liegen andere regulatorische Mechanismen als beim RVD zugrunde (19). Es wurde vorgeschlagen, dass die Aktivierung von ENaC bei niedrigen basolateralen Osmolalität in zwei Phasen verläuft: die frühe nicht-genomische und die späte genomische Phase (16). In der frühen, nicht-genomischen Phase steigt der Natriumtransport ca. 10 min nach hypotonischem Stress, bedingt durch die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) und Plättchen-Wachstumsfaktor spielen eine Rolle. In der späten, genomischen Phase steigt die Expression von mRNA für SGK1 und alle drei ENaC-Untereinheiten an (16). In der frühen Phase wird beim hypotonischen Stress auch ein biphasischer Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}$  beobachtet. Es wird

vermutet, dass dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg eine Bedeutung bei der Regulation der Genexpression zukommt (16). Abbildung 4 zeigt ein entsprechendes Schema.



**Abb. 4:** Schematischer Ablauf der Signale, die zu erhöhtem Natriumtransport, ausgelöst durch hypotonischen Stress führen. Grafik aus (16), leicht verändert.

Der hypotonische Stress führt sowohl zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle, als auch zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern (15). Dabei aktiviert der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$ -Ionenkanäle für den RVD (15).

Es ist noch nicht genau geklärt, wie die PLA2 und ihre Metabolite an der Regulation des Natriumtransportes beim hypotonischen Stress in Epithelzellen beteiligt sind. PLA2 führt zur Freisetzung von Arachidonsäure und ihr Metabolismus zur Bildung von Prostaglandin E2 (PGE2) (19). PGE2 führt zum Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in der Zelle und zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) (19). In der Tat kommt es beim hypotonischen Stress in einigen Epitheltypen zum Anstieg von cAMP. In isotonischer Lösung stimuliert cAMP in A6 Zellen den Natriumtransport via PGE2 (19). In Macula densa Zellen der Mausniere (MMDD1-Zellen) kam es bei der Behandlung mit Lösung niedriger Osmolalität nach einer Stunde zur Freisetzung von PGE2 und zur Erhöhung der COX-2-Expression (20). Da die Aktivierung des Kalzium-sensitiven-Rezeptors durch den PLA2-

Inhibitor Quinacrin beim hypotonischen Stress in A6-Zellen unterbunden werden kann (7), wird auch ein Zusammenhang von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  und dem PLA2 Signalweg vermutet.

### 1.3 Hemmung der Phospholipase A<sub>2</sub> und ihrer Metabolite in A6 Zellen

Die Bedeutung der PLA2 bei der Regulation des epithelialen Natriumkanals durch Änderung der Osmolalität wurde mit Inhibitoren von PLA2 und ihrer Metabolite untersucht.

Abbildung 5 gibt eine Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Hemmstoffe.

Aus der Literatur (19) ist bekannt, dass Quinacrin in der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (7) beim hypotonischen Stress in A6-Zellen  $I_{\text{sc}}$  inhibieren kann. Quinacrin ist historisch als Antimalariamittel bekannt, wird aber heutzutage nur in Sonderfällen (21) oder als Antiprotozoikum bei der Behandlung von Giardia-Infektionen eingesetzt (22). Quinacrin ist auch ein unspezifischer Inhibitor der PLA2 (23). Wegen dieser geringen Spezifität wurde ein weiterer Inhibitor von PLA2, Aristolochia-Säure (24;25) verwendet. Die eingesetzte Konzentration von Aristolochia Säure betrug 100  $\mu\text{M}$  und hemmt besonders die calciumregulierte Form der PLA2 (25). Aristolochia-Säure ist ein pflanzlicher Stoff, den eine Vielzahl von Pflanzen aus der Familie Aristolochiaceae birgt. In China ist Aristolochia-Säure in diversen Schlangheilmitteln enthalten. In der traditionellen iranischen Medizin finden Aristolochia-Säure haltige Pflanzen in der Therapie von Kopf- und Rückenschmerzen Verwendung. Dabei ist die Aristolochia-Säure toxisch und kann sogar zur Aristolochia-Säure Nephropathie führen (26).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige PLA2 (iPLA2) wird durch Bromoenol-Lacton (BEL) gehemmt (27;28). 5  $\mu\text{M}$  BEL hemmen iPLA2  $\beta$  und  $-\gamma$  der Ratte zu 80-100% (28). BEL wirkt irreversibel und ist ebenfalls toxisch (29).

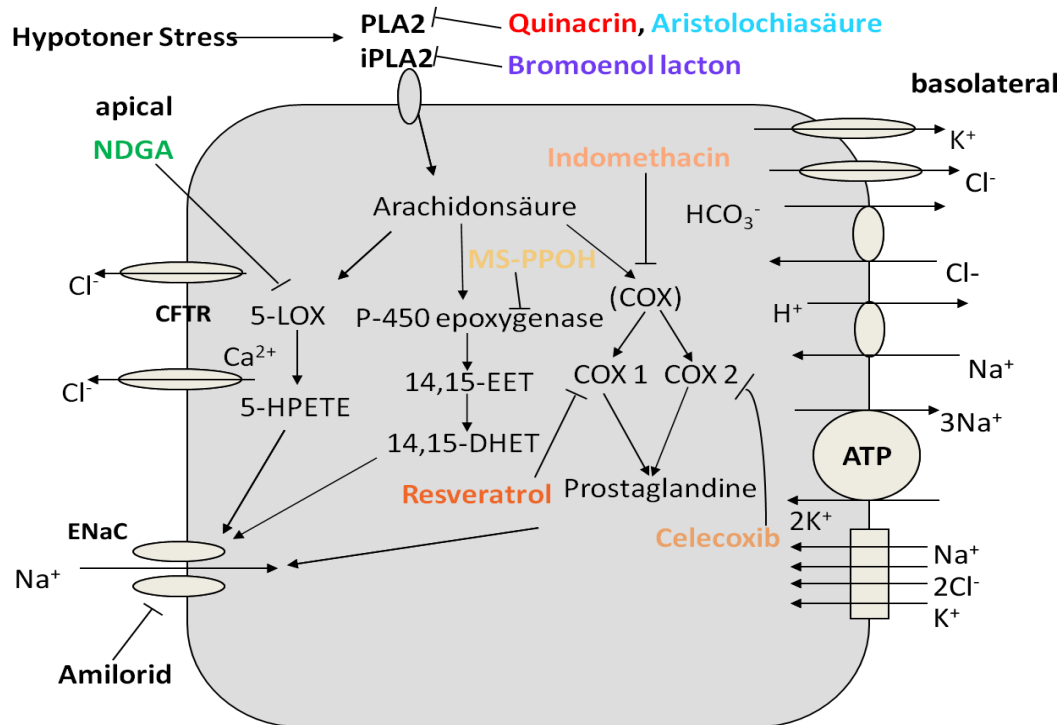
Im weiteren Verlauf der Signaltransduktion über PLA2 liegt die Arachidonsäure und ihre Metabolite, die Prostaglandine und Leukotriene. Nordihydroguaiarsäure (NDGA) ist ein spezifischer Inhibitor von Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LO). 5-LO oxidiert Arachidonsäure in 2 Schritten zu Leukotrien A (30). NDGA ist die biologisch aktive Substanz des Kreosotbusches (*Larrea tridentata*), der gehäuft in traditioneller Medizin z.B. als entzündungshemmendes Mittel oder in der Behandlung von Diabetes mellitus verwendet wird. NDGA wirkt antikanzerogen, antidiabetisch, entzündungshemmend, antiviral und antioxidativ (31). Es wurde berichtet, dass bereits 20  $\mu\text{M}$  NDGA Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LO) in MCF 7-Brustkrebszellen hemmen (32).

Indomethacin wurde als unspezifischer Inhibitor der Cyclooxygenasen (COX) zur Untersuchung der Rolle der Prostaglandine bei der Regulation von ENaC beim hypotonischen Stress benutzt. Indomethacin ist ein nichtselektiver Inhibitor von COX-1 und COX-2 (33). Indomethacin gehört zur Gruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR). Wie alle anderen NSAR hat Indomethacin im sauren Entzündungsmilieu eine starke antiphlogistische Wirkung und wird bei der Behandlung des akuten Gichtanfalls und bei rheumatischen Erkrankungen eingesetzt (34). Es wurde gezeigt, dass bereits die Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Indomethacin in A6 Zellen zur Hemmung des osmotisch regulierten Natriumtransportes führte (19).

Für die Unterscheidung zwischen COX-1 und COX-2 wurden jeweils spezifischere Inhibitoren eingesetzt. Resveratrol ist ein COX-1 Inhibitor (33). Resveratrol gehört zu der Gruppe der Polyphenole und kommt in ca. 70 Pflanzenarten, vor allem in Weintrauben vor und ist deshalb in Rotwein enthalten (35). Resveratrol ist ein Antioxidans und besitzt eine antientzündliche, immunmodulatorische, kardio- und neuroprotektive Wirkung (36). Eine Resveratrol-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  soll COX-1 in M1 Zellen hemmen (33).

Celecoxib ist ein COX-2 Hemmstoff (37). Celecoxib ist chemisch nicht mit NSARs verwandt und gehört nicht zu den sauren Verbindungen. Celecoxib wird in der Behandlung der Arthritis rheumatica und der Osteoarthritis eingesetzt (34). Es wurde berichtet, dass die nötige Konzentration zur Hemmung der COX-2 in menschlichen Nicht-Kleinzellen-Lungenkarzinom-Zellen (NSCLC) 20  $\mu\text{M}$  betrug (38).

Zuletzt wurde die Beteiligung von Cytochrom P450-Epoxygenasen und ihrer Metabolite bei der Aktivierung von ENaC beim hypotonischen Stress untersucht. N-(methylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy)-benzenehexanamid (MS-PPOH) ist ein spezifischer Hemmstoff der Cytochrom P450-Epoxygenasen in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  (39).



**Abb. 5:** Modell der A6 Zelle mit den hypothetischen Signalwegen der durch hypotonen Stress ausgelösten Aktivierung von ENaC und den möglichen Angriffsorten für Inhibitoren (siehe Text) der PLA2 und ihrer Metabolite. Phospholipase A2 (PLA2); Calcium-unabhängige Phospholipase A2 (iPLA2); Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LOX); 5-Hydroxyperoxyarachidonsäure (5-HPETE); Epoxyeicosanotriensäure (14,15-EET); Dihydroxyeicosanotriensäure (14,15-DHET); Cyclooxygenase (COX).

## 1.4 Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC)

ENaC wird vielfältig gesteuert. Insbesondere für die Kontrolle der Anzahl der Kanäle in der Membran durch sogenanntes „Trafficking“ (kontrollierte Exo- und Endocytose von Membranproteinen) spielen Kinasen und die damit verbundenen Signalwege eine wichtige Rolle (40). Sie münden entweder in der Phosphorylierung von ENaC beta/gamma Untereinheiten oder von Nedd4-2, einer Ubiquitin Protein Ligase, welche an der Entfernung von ENaC aus der Membran beteiligt ist. Für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung sind Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAP-Kinasen), die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC). Sie werden im Folgenden genauer eingeführt.

**MAP-Kinasen:**

Laut Taruno et al. (41) aktiviert der hypotonische Stress ENaC in A6 Zellen via RTK-JNK/SAPK-Kaskade, die zu MAP-Kinasen zählen. Durch MAP-Kinasen wird die genregulatorische Antwort auf extrazelluläre Stimuli wie z.B. Stress, UV-Licht oder einen osmotischen Stress vermittelt (42;43). Bei den MAP-Kinase-Signalwegen handelt es sich um mehrere nacheinander geschaltete Kinasen, dabei werden Enzyme der gleichen Ebene die MAP3K, MAPKK, MAPK, MAPKAPK genannt (42). MAP-Kinasen werden direkt durch Phosphorylierung aktiviert (42). Sie sind bei der Steuerung der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und des programmierten Zelltodes beteiligt (43). Die Phosphorylierungskaskade beginnt mit der Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), des Fibroblasten-Wachstumsfaktors (FGF), des insulinähnlichen Wachstumsfaktors (IGF), Zytokinen, usw. an den jeweiligen spezifischen Transmembranrezeptor an der Zelloberfläche (44). Dabei gehören die Transmembranrezeptoren zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) (44). Dimerisierung und Autophosphorylierung von RTK-Rezeptoren führt zur Aktivierung weiterer Signalkaskaden, welche die Transkription einer Vielzahl an Zielgenen regulieren (44). Bei MAP-Kinasen unterscheidet man grundsätzlich drei Signalwege (42;43):

- 1) ERK-1 und ERK-2 (extracellular signal-related kinases) werden durch Wachstumsfaktoren und Mitogene aktiviert (42). Dabei entsteht die Phosphorylierungskaskade  $\text{Raf} \rightarrow \text{MEK } 1/2 \rightarrow \text{ERK } 1/2$  (42;43). ERK1/2 sind bei der Aktivierung der JNK/SAPK -Kaskade beteiligt (45).
- 2) p38-mitogenaktivierte Proteinkinase wird durch Stress, UV-Licht, Osmotischer Stress und Zytokine ( $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-6}$ ) aktiviert und ist an der Enzymregulation, z.B. COX-2 oder an der Produktion von Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  ( $\text{TNF-}\alpha$ ) beteiligt (46). Es kommt zur Kaskade  $\text{TAK/ASK/MEKK1-4} \rightarrow \text{MKK } 3/6 \rightarrow \text{p38}\alpha,\beta, \gamma/\text{ERK6/MXI}$  (43).
- 3) c-Jun N-terminale Kinasen (JNK), die auch die stress-activated phospho-kinases (SAPK) genannt werden (43), werden durch Stress, Zytokine, Wachstumsfaktoren und durch osmotischen Stress aktiviert (41;45). JNK/SAPK aktiviert die Kaskade  $\text{MEKK1/4, MLKs, ASK, TAK } 1 \rightarrow \text{MKK4/7} \rightarrow \text{JNK/SAPK}$  (45).



**PI3K:**

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) wird wie der MAP-Kinase-Signalweg sowohl via Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) (47), als auch via G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und via onkogenes Ras (48) aktiviert. Die aktivierte PI3K wandelt Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) durch Phosphorylierung in Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) (48). PIP<sub>3</sub> kann AKT (Proteinkinase B), Pyruvat Dehydrogenase Kinase, Isozym 1 (PDK1) aktivieren (47). PDK1 kann sowohl weitere Substrate wie z.B. SGK1 (49) aktivieren, als auch AKT im aktivierten Zustand halten (50). AKT führt zur Entstehung weiterer Substrate wie z.B. der Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3B) und dem Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) (48). Durch den PI3K-Signalweg werden in der Zelle Abläufe wie das Zellwachstum, die Zellproliferation, die Differenzierung und das Überleben beeinflusst (47;48). Tumorsuppressor Phosphatase and Tensin homolog (PTEN) dephosphoryliert PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> (51) und verhindert damit die Aktivierung von AKT.

**PKA:**

Unterschiedliche Hormone wie z.B. das Antidiuretische Hormon (ADH), Dopamin, Adrenalin, Oxytozin und Prostaglandine wirken über die cAMP-PKA-Achse (52). ADH aktiviert ENaC sowohl durch die Steigerung seiner Anzahl in der apikalen Membran (1), als auch durch Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit und Translokation des ENaC aus dem intrazellulären Speicher (3). Dabei ist die aktivierende Wirkung von ADH auf ENaC ähnlich der Aldosteronwirkung auf die Serum und Glukokortikoid-induzierbare Proteinkinase (SGK1) (53;54). SGK1 phosphoryliert Nedd4-1 und/oder Nedd4-2 und bringt beide Ubiquitin-Protein Ligasen in den inaktiven Zustand (54) (Bei der Ubiquitinierung bindet der WW-Bereich von Nedd4-1 und/oder Nedd4-2 an den PY-Bereich (PPPXY) des Carboxyterminus aller drei ENaC-Untereinheiten). Damit wird die ENaC-Ubiquitinierung, seine Internalisierung und damit der Abbau verhindert und die ENaC-Anzahl am apikalen Zellpol wird erhöht (54). PKA gehört zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen (55), d.h. sie phosphoryliert Proteine an den OH-Gruppen ihrer Tyrosin-, Serin- oder Threonin-Reste (52). PKA ist ein Heterotetramer und besteht aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten (55). Jede regulatorische Untereinheit kann zwei cAMP Moleküle binden (55). Nach der Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit werden die katalytischen Untereinheiten frei (52). Die freien katalytischen Untereinheiten steuern die Proteinphosphorylierung und vermitteln damit die regulatorischen Wirkungen auf die Zellfunktionen (52). PKA kann direkt ENaC durch Phosphorylierung der  $\beta$  und  $\gamma$ -ENaC-Untereinheiten aktivieren (56). PKA kann auch

die Chloridsekretion durch die Aktivierung der luminalen CFTR-Chloridkanäle aktivieren (57).

**PKC:**

Proteinkinase C hemmt ENaC (1;58). PKC steht für eine Gruppe von PKC Isoformen und gehört wie die PKA zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen (52). Hormone wie z.B. Acetylcholin aktivieren PKC indirekt durch die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (52). Diese aktivieren zunächst Phospholipase C, die PIP<sub>2</sub> in IP<sub>3</sub> (Inositol-1,4,5-trisphosphat) und Diacylglycerin (DAG) spaltet (52). IP<sub>3</sub> führt zur Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Calciumspeichern (52). Ca<sup>2+</sup> aktiviert mit DAG zusammen PKC (52).

## 1.5 Phospholipase A2 und ihr Metabolismus

Die Phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) unterteilt man in 3 Typen: die sezernierte PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>), die zytosolische PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) und die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>). sPLA<sub>2</sub> und cPLA<sub>2</sub> sind Ca<sup>+</sup> abhängig. Die sezernierte PLA<sub>2</sub> besitzt eine niedrige molekulare Masse und weist N-terminal ein sekretorisches Signalpeptid auf (59). Die sPLA<sub>2</sub> ist z.B. ein wichtiger Bestandteil im Pankreassekret oder in der Synovialflüssigkeit im Rahmen entzündlicher Gelenkerkrankungen (60). Die zytosolische PLA<sub>2</sub> kommt in 3 Subtypen vor: cPLA<sub>2</sub>α, cPLA<sub>2</sub>β, cPLA<sub>2</sub>γ und besitzt eine hohe molekulare Masse. cPLA<sub>2</sub> ist die meist beschriebene PLA<sub>2</sub>. N-terminal befindet sich ein Ca<sup>2+</sup>-bindender Abschnitt und C-terminal ein katalytisches Zentrum (59). cPLA<sub>2</sub> wird durch sub-mikromolare Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und durch Phosphorylierung aktiviert (61). cPLA<sub>2</sub> hat die höchste Affinität zur Arachidonsäure und es wird vermutet, dass nur cPLA<sub>2</sub> zur Freisetzung von AA in der Lage ist (24;62). cPLA<sub>2</sub> hydrolysiert spezifische Phospholipide in der sn2- Esterbindung (24). Dabei werden freie Fettsäuren, Lysophospholipide und Arachidonsäure frei (24).

iPLA<sub>2</sub> kommt in zwei Subtypen hoher molekulare Masse vor: iPLA<sub>2</sub>β und iPLA<sub>2</sub>γ (59).

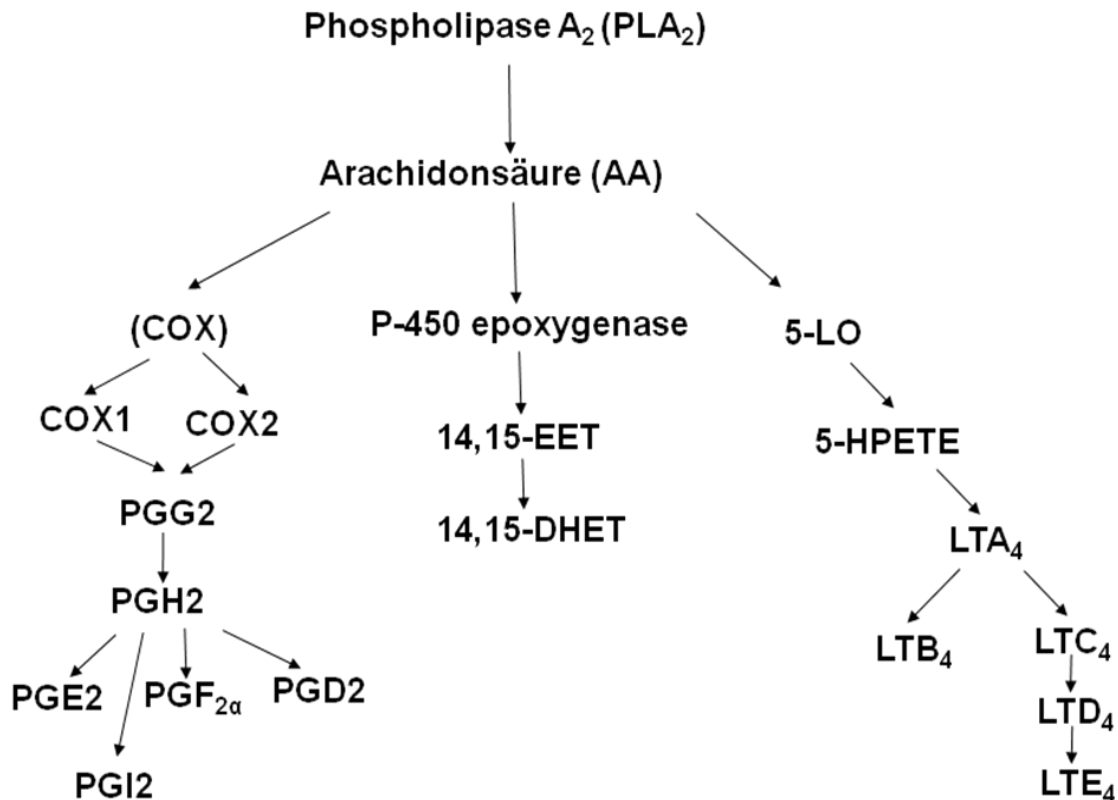
Arachidonsäure kann selbst den Natriumtransport beeinflussen oder dient als Vorstufe für weitere Eikosanoide, wie Prostaglandine, Leukotriene und Epoxyeicosatriensäuren (24). Die Abbildung 6 zeigt verschiedene metabolische Pfade der Arachidonsäure sowie beteiligte Schlüsselenzyme.

Die Phospholipase A2 spielt beim kontrollierten Verlust von Cl<sup>-</sup> und K<sup>+</sup> im Rahmen der Volumenregulation (RVD) nach Zellschwellung eine wichtige Rolle (59;63). Durch

hypotonische Zellschwellung wird der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und damit der ERK-1/ERK-2 bzw. der PI3K-Signalweg in unterschiedlichen Zelltypen aktiviert (59). MAP-Kinasen spielen eine Schlüsselrolle im PLA2-Signalweg beim hypotonischen Stress (59;63). Die Wirkung der PLA2 in A6 Zellen ist nicht eindeutig: PLA2 Hemmung mit Aristolochia-säure aktiviert einerseits den Natriumtransport an der apikalen Membran und inhibiert andererseits den Natriumtransport an der basolateralen Membran (24). In M1-Zellen hemmt Arachidonsäure den Natriumtransport über das P450-Epoxygenaseprodukt 11,12-Epoxyeicosatriensäure (64). Aus Arachidonsäure entstehen mittels Cyclooxygenasen Prostaglandine. Sowohl Prostaglandin-E<sub>2</sub>, als auch Prostaglandin-F<sub>2α</sub> aktivieren ENaC (64). In A6 Zellen soll die akute basolaterale Wirkung von PGE<sub>2</sub> den Natriumtransport via IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>/PKC-Signalweg hemmen (65). Dabei vermindert PGE<sub>2</sub> die Offenwahrscheinlichkeit von ENaC (65). Dagegen stimuliert die chronische basolaterale Wirkung von PGE<sub>2</sub> den Natriumtransport über den cAMP/PKA-Signalweg und die ENaC-Anzahl an der apikalen Membran wird gesteigert (65). Die unterschiedliche Wirkung der Prostaglandine auf den Natriumtransport ist durch verschiedene Prostaglandinrezeptoren EP1-EP4 bedingt (66). Im Aldosteron-sensiblen distalen Nephron (ASDN) sind ausschließlich die Prostaglandinrezeptoren EP1, EP3 und EP4 vorhanden (67). EP1- und EP3-Prostaglandinrezeptoren befinden sich an der basolateralen Membran und inhibieren den Natriumtransport (66;68;69). Der EP1-Prostaglandinrezeptor wirkt über den IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>/PKC - Signalweg (66;68). Der EP3-Prostaglandinrezeptor führt über Gi-Protein-Koppelung zum Abfall von cAMP und er kann auch MAP-Kinasen und PI3K aktivieren (37).

Der EP4-Prostaglandinrezeptor befindet sich an der luminalen Membran und aktiviert ENaC über den cAMP/PKA Signalweg (66).

Über die Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LO) entsteht aus Arachidonsäure Leukotrien D4. Es stimuliert ENaC in A6 Zellen (70).



**Abb. 6:** Arachidonsäure und ihre Metabolite Prostaglandin (PG), Eicosanotriensäure (ET) und Leukotrien (LT). Die Schlüsselenzyme sind Cyclooxygenase (COX), P-450 Epoxygenase und Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LO).

Mit Hilfe von Cyclooxygenasen werden aus Arachidonsäure Prostaglandine synthetisiert. Es gibt zwei Isoenzymen der Cyclooxygenase: Die Cyclooxygenase-1 (COX-1) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2). Die Existenz einer Cyclooxygenase-3 wird vermutet. COX-1 und COX-2 besitzen dieselben Substrate, Produkte und katalysieren dieselben enzymatischen Reaktionen. COX-1 reguliert unter physiologischer Bedienung die Synthese von Prostaglandinen. Die Transkription von COX-2 wird unter Stress (z.B. Entzündungsprozesse) angeregt (62;71). Mit Hilfe der Cyclooxygenasen werden aus AA Prostaglandine-Serie-2 produziert. Prostaglandin-H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) ist Vorläufer für alle andere Prostaglandine-Serie-2: Prostaglandin-E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Prostaglandin-I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), Prostaglandin-F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>). Prostaglandine wirken über Prostaglandinrezeptoren. Prostaglandinrezeptoren EP1-EP4 gehören zu Gruppe der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren. Cyclisches Adenosinmonophosphat und Ca<sup>2+</sup> dienen als Second-Messenger für Prostaglandinrezeptoren (72).

Aus Arachidonsäure wird mit Hilfe des Enzyms Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LO) über 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HPETE) das instabile Leukotrien A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) gebildet.

LTA<sub>4</sub> dient als Vorläufer für alle andere Leukotriene. Aus LTA<sub>4</sub> entstehen Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) und Cysteinyl-Leukotriene: Leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), Leukotrien D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>), Leukotrien E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>). Leukotrienrezeptoren gehören zu Gruppe der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren. Ca<sup>2+</sup>-Ionen, cAMP und Diacylglycerin (DAG) sind Second-Messenger-Systeme für Leukotrienrezeptoren. LTB<sub>4</sub> wirkt über Leukotrienrezeptoren BLT1 und BLT2, Cysteinyl-Leukotriene wirken über CysLT1 und CysLT2 Rezeptoren (73).

Über Cytochrom P450-Epoxygenasen entstehen aus Arachidonsäure Epoxyeicosatriensäuren (EETs). EETs sind Produkte der CYP2C- und CYP2J-Enzymfamilie. EETs bilden Regioisomere 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET; 14,15-EET. In der Niere sind von großer Bedeutung 11,12- und 14,15-EET. 11,12- und 14,15-EET führen zur Vasodilatation und wirken natriuretisch und damit antihypertensiv. EETs werden durch lösliche Epoxidhydroxylase (sEH) zu DHETs (dihydroxyeicosatrienoic acids) abgebaut. DHETs haben keine oder eine schwache antihypertensive Wirkung (74). EETs aktivieren Ca<sup>2+</sup>-abhängige K<sup>+</sup>-Kanäle (BKCa) mit großer Leitfähigkeit. Die Aktivierung der BKCa führt zum Einstrom von K<sup>+</sup>-Ionen in die glatte Muskulatur der Gefäße. Es resultiert eine Hyperpolarisation und Vasodilatation (74;75). Im kortikalen Sammelrohr hemmen EETs (insbesondere die 11,12-EET) ENaC (76).

Die Wirkung von EETs wird vermutlich sowohl über klassische G-Protein gekoppelte Rezeptoren, als auch direkt am Zielprotein im Zytosol oder in der Membran erreicht (75).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Phospholipase A2 und ihrer einzelnen Metabolite in der Regulation des epithelialen Natriumkanals beim hypotonischen Stress untersucht. Sie versucht die folgenden Fragen zu klären: Ist die Phospholipase A2 oder einer ihrer Metabolite bei der Regulation des Natriumtransportes bei Änderung der Osmolalität beteiligt? Über welche Signalwege findet die Regulation statt? Sind einzelne Signalwege unabhängig voneinander oder hängen sie zusammen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

Im Laufe meiner Arbeit hatte ich ständige Unterstützung durch Dipl.-Biologin Sandra Grüssel, an deren Zellkulturprotokoll ich mich orientiert habe.

Die A6 Zellen stammen von Dr. J. P. Johnson, Universität Pittsburgh, Pittsburgh, PA und wurden freundlicherweise von Prof. Paul Steels bzw. Dr. Humbert De Smedt, K.U.Leuven Belgien zur Verfügung gestellt.

A6 Zellen stammen aus dem distalen Nierentubulus von *Xenopus laevis*. Die Dauer der Kultivierung betrug 9 bis 25 Tage. Die verwendeten Zellpassagen waren 89 bis 96. Die Zellen benötigten eine Temperatur von 28 °C und 1% CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Heraus HeraCell).

Das verwendete Zellkulturmedium war eine Mischung (1:1) aus Leibovitz's L-15 (Sigma-Aldrich) und Ham's F-12 Supplement (Lenaxa, Kansas).

Außerdem wurden zugefügt:

- 10% FCS (Biochrom AG, Berlin)
- 2,6 mM NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich)
- 3,8 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich),
- 100 U/ml penicillin
- 100 µg/ml streptomycin

Die Osmolalität betrug 260 mosmol/kg, pH-Wert 8,2.

Die Zellpassage wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde in die Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup> bzw. 75 cm<sup>2</sup>) 1-2 ml Accutase gegeben. Danach wurden die Zellen für 15 min bei 28 °C inkubiert. Die vom Boden abgelösten Zellen wurden mit 10 ml PBS resuspendiert, in 15ml Röhrchen überführt und bei 1000g 10 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 5ml Zellmedium resuspendiert.

Die Zellen wurden in der Zählkammer (Neubauer improved, Kammerfaktor 10<sup>4</sup>) mittels eines Olympus CK2 Mikroskops (Olympus Optical CO., LTD.) gezählt. Dafür wurde die Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis [1:2] versetzt.

$$\text{Zellen} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{Verdünnung} = \text{Zellen/ml} \quad (1)$$

$$(\text{Zellen/ml}) \times V_{\text{ges}} = \text{Gesamtzellzahl} \quad (2)$$

Bei der Neuaussaat wurden 500µl bzw. 1000µl Zellsuspension in eine 5ml bzw. 20ml Kulturflasche gegeben. Das restliche Volumen wurde mit Kulturmedium aufgefüllt.

Bei der Neuaussaat wurde die Passagezahl um eins erhöht.

Für die Experimente wurden die Zellen auf permeablen Filtern ausgesät. Die in den Experimenten verwendeten Filter waren Corning Costar Transwell Permeable Supports Nr. 3470 aus Polyester (PET). Bei der Aussaat auf die Filter wurde eine Zellzahl von  $0,75 \times 10^4$  pro Filter gewählt. Das notwendige Zellsuspensionsvolumen wurde folgendermaßen ausgerechnet:

$$V_{\text{Filter}} = \frac{0,75 \times 10^4 \text{ Zellen}}{\text{Zellen/ml}}$$

Die Filterplatte wurde bei einer Temperatur von 28 °C und 1% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage.

## 2.2 Kontrolllösung

Die verwendete Kontrolllösung für die Experimente in der Ussing-Kammer war eine Ringer-Lösung ohne Magnesium.

Stoff	Molmasse [g/mol]	Konzentration [mmol/l]	Einwaage [g] für 5l
NaCl	58,44	123,5	36,0865
KHCO <sub>3</sub>	100,12	2,5	1,2515
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	147,02	1	0,7350
Glucose	180,16	5	4,504

**Tab. 1:** Zusammensetzung der Kontrolllösung; pH: 8,2 (NaOH; HCl); Osmolalität: 260 mosmol/kg

Stoff	Molmasse [g/mol]	Konzentration [mmol/l]	Einwaage [g] für 5l
NaCl	58,44	73,5	21,4765
KHCO <sub>3</sub>	100,12	2,5	1,2515
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	147,02	1	0,7350
Glucose	180,16	5	4,504

**Tab. 2:** Zusammensetzung der hypotonen Lösung; pH: 8,2 (NaOH; HCl ); Osmolalität 160 mosmol/kg

Die Osmolalität der verwendeten Lösungen belief sich auf 260 mosmol/kg (isoosmolare Kontrolllösung) und 160 mosmol/kg (hypoosmolare Lösung). Die Osmolalität wurde mit NaCl eingestellt.

Die Messung der Osmolalität wurde mit Hilfe eines Gefrierpunkt Osmometers OSMOMAT<sup>®</sup> 030 von Gonotec durchgeführt. Die Zweipunkteichung erfolgte am Osmomat mit 850 mosmol/kg und 0 mosmol/kg (Aqua dest.).

Für das Abwiegen wurde eine Mettler AE IC3 Waage und für die Einstellung des pH-Wertes ein Knick Präzisions pH-Meter verwendet.

## 2.3 Substanzen

Die eingesetzten Chemikalien waren vom höchsten Reinheitsgrad. Amilorid wurde von der Firma Sanofi freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Ethanol (99,9 %), p.a. – Merck, Darmstadt, D war das Lösungsmittel für Resveratrol und Nordihydroguaiaretic acid (NDGA).

Dimethylsulfoxid (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO, M=78,13 g/mol, von Carl Roth GmbH + Co. KG) diente als Lösungsmittel für Celecoxib, Indomethacin, Amilorid, Bromoenol lactone (BEL), MS-PPOH.

Alle Inhibitoren wurden zur basolateralen Seite zugegeben und waren im Laufe des ganzen Experiments präsent. Die Konzentration des Lösungsmittels in der Experimentallösung war stets kleiner als 1 Promille und hatte in dieser Konzentration keinen Eigeneffekt. Die Substanzen wurden von Firmen Sigma-Aldrich und Biomol bezogen.



## 2.4 Ussing-Kammer

### 2.4.1 Funktion und Aufbau

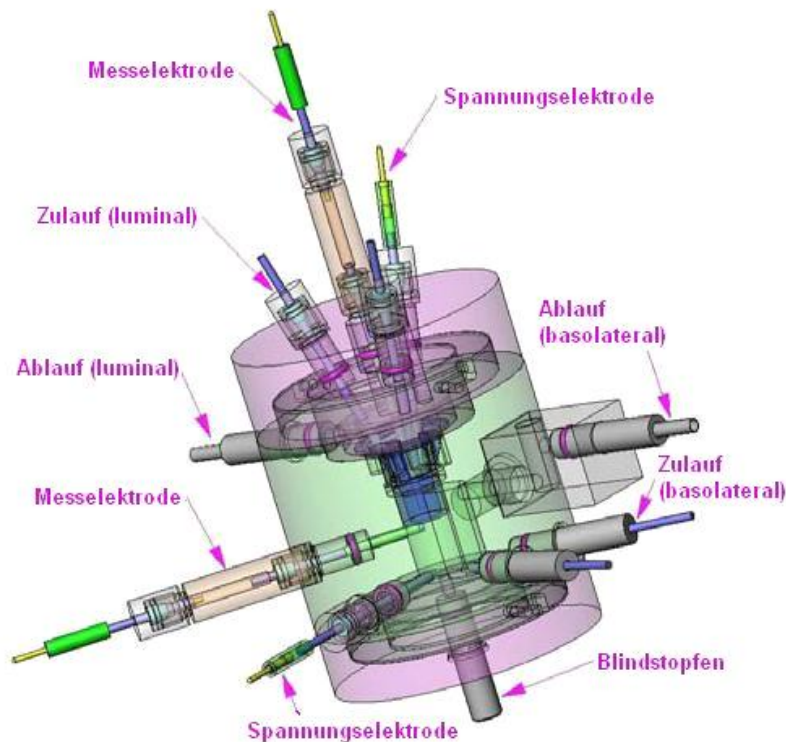
Die Messung des transepithelialen Potenzials (TEP) wurde mit der Hilfe der Ussing-Kammer durchgeführt. Für diese Arbeit wurden zwei Ussing-Kammern nach Willy van Driessche (Abbildung 7) (77).

Die Ussing-Kammer besteht aus zwei voneinander getrennten Halbkammern, was die Trennung zwischen der luminalen (obere Halbkammer) und der basolateralen (untere Halbkammer) Seite ermöglicht. Die Fassung der oberen Halbkammer beträgt 1,1 ml und der unteren 1,6 ml. Die elektrische Isolierung zwischen den beiden Halbkammern besteht aus einem passenden O-Ring. Der costar® Transwell® Filtereinsatz wird durch diesen Ring hindurch in die untere Halbkammer eingesetzt.

Es gab zwei Typen von Silber-Chlorid Elektroden: Messelektrode und Stromelektrode. Wenn die Stromelektrode nach dem Chlorieren sofort zum Einsatz bereit war musste die Messelektrode noch zusammen gebaut werden. Die Messelektrode bestand aus einer chlorierten Elektrode, 1 M KCl und einer Agarbrücke (2,5% Agar in 1M KCl).

Die Messelektroden wurden dicht vor der Epitheloberfläche platziert. Die beiden Halbkammern wurden kontinuierlich perfundiert. Die Experimentallösung wurde über Zulaufheizungen (TC344B bzw. TC-324B Automatic Temperature Controller und Inline Heater, Modell SH-27B, Warner Instrument Corporation) auf 28 C° aufgeheizt und konstant gehalten. Die Verstärkung des Signals von  $U=100\text{mV/mV}$  erfolgte über den Ussing-Verstärker UPG3 (AD-Elektronik, Buchenbach). Der Strompuls war periodisch (7/min, Dauer 2s) und betrug 1  $\mu\text{A}$ . Das Spannungssignal wurde analog auf Schreiberpapier aufgezeichnet. Die Messschreiber von der Firma Kipp und Zonen hatten eine Durchlaufgeschwindigkeit von 0,2mm/s.

Die Messung wurde im Open-Circuit Modus durchgeführt. Die tatsächlichen Werte wurden nach Abzug des Leerwertes berechnet (Costar® Transwell® Filter ohne Gewebe). Der Leerwert wurde stets zu Beginn und am Ende der Messungen kontrolliert.



**Abb. 7:** Ussing-Kammer nach Willy van Driessche; mögliche Anordnung der Anschlüsse (Grafik aus (77), verändert)

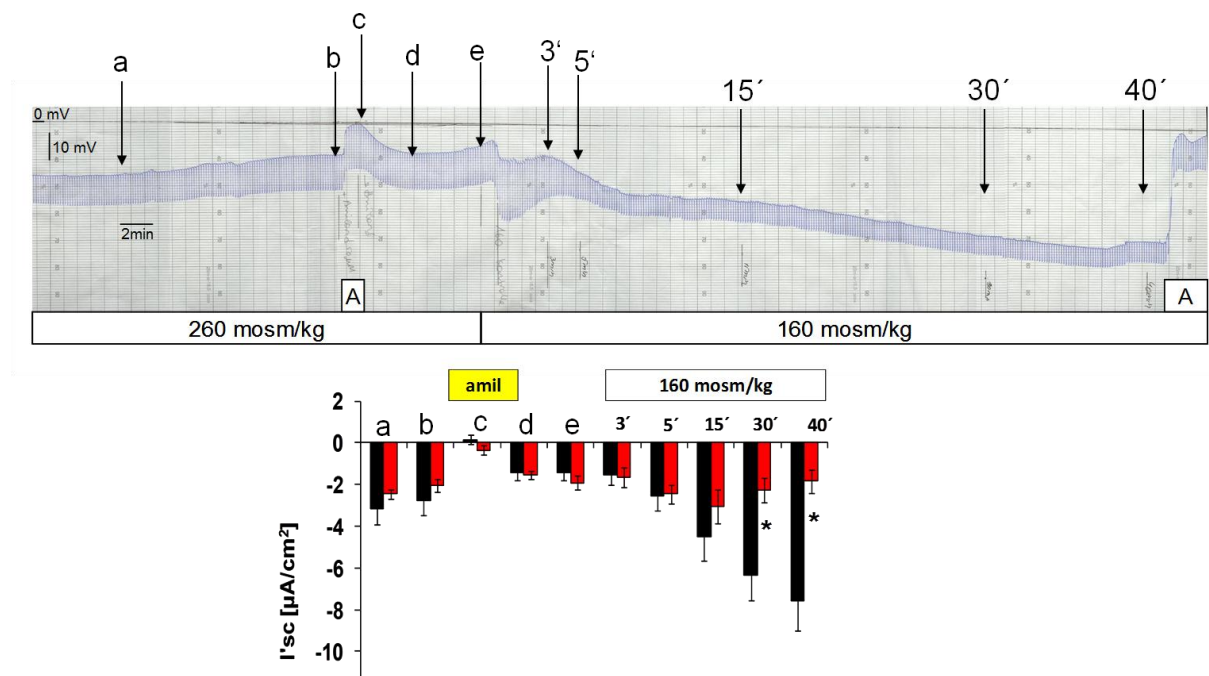
### 2.4.2 Messprotokoll

Um die Konfluenz der Zellschichten zu überprüfen wurde der elektrische Widerstand des Epithels unter Zellkulturbedingungen (TEER) mit Hilfe eines Widerstandsmessgerätes (EVOM) über ein mit Elektroden versehenes Kulturschälchen (Endohm-6), beides World Precision Instruments Inc., gemessen. Der charakteristische TEER Wert von konfluenten A6 Zellen lag über  $4000 \Omega \times \text{cm}^2$  und wurde als Untergrenze für die Verwendung der Filter in der Ussing Kammer gesetzt.

In der Ussingkammer führte der abgegebene Strompuls ( $I(\text{Puls})$ ) zum Spannungsabfall  $\Delta V_{\text{te}}$ . Auf dem Messschreiberpapier konnten  $V_{\text{te}}$  und  $\Delta V_{\text{te}}$  sofort ausgemessen werden, woraus  $R_{\text{te}}$ ,  $I'_{\text{sc}}$  und  $\Delta I'_{\text{sc}}$  nach dem Ohm'schen Gesetz berechnet werden konnten. Da der Widerstand des leeren Filters nur etwa 1% des Gesamtwiderstandes betrug, wurde auf eine Leerwertkorrektur von  $R_{\text{te}}$  verzichtet.

Alle Versuche verliefen ähnlich. Sowohl die obere, als auch die und untere Kammer wurden mit Kontrolllösung gefüllt. Die Filter aus der Kontrollgruppe oder der Stoffgruppe wurden in die Ussing-Kammer eingespannt. Danach bekamen die Gewebe ca. 30 min Zeit, sich an die neuen Bedingungen zu gewöhnen. Während dieser Zeit wurde Amilorid ( $50\mu\text{M}$ ) zur oberen

Kammer für ca. 2 min zugegeben und in Anschluss ausgewaschen. Isoosmolare Kontrolllösung (260 mosmol/kg) wurde durch hypoosmolare Kontrolllösung (160 mosmol/kg) in den beiden Halbkammern ausgetauscht. Danach wurden die Gewebe für ca. 40 min dem hypotonischen Stress ausgesetzt. Während dieser Zeit lief in der Kontrollgruppe nur hypoosmolare Kontrolllösung beidseits. In der Stoffgruppe lief in der luminalen Halbkammer hypoosmolare Kontrolllösung, in der basolateralen Halbkammer hypoosmolare Kontrolllösung unter Zugabe eines Hemmstoffs in entsprechender Konzentration. Am Ende dieses Abschnittes wurde wieder Amilorid zur oberen Kammer für ca. 2 min zugegeben und in Anschluss ausgewaschen. Der äquivalente Kurzschlussstrom ( $I'_{sc}$ ) wurde nach 3', 5', 15', 30', 40' ausgerechnet. Abbildung 8 zeigt eine beispielhafte Aufzeichnung einer Messung.



**Abb. 8:** Darstellung des typischen Verlaufes der Spannungsaufzeichnung gegen die Zeit in einem Experiment mit hypotonischem Stress in A6 Zellen. Originalaufzeichnung auf Schreiberpapier. a - Ausgangswert nach dem Beginn des Experimentes; b - Vorkontrolle zu Amilorid; c - in Anwesenheit von Amilorid [A]; d - nach Auswaschen von Amilorid; e - Vorkontrolle vor dem hypotonischem Stress; 3', 5', 15', 30', 40'-Zeit nach Einsetzen des hypotonischen Stress. Am Ende Hemmung mit Amilorid [A] zum ENaC Nachweis der stressbedingten Spannungsänderung. Die Säulengrafik im unteren Bildteil zeigt die Mittelwerte der berechneten äquivalenten Kurzschlussströme ( $I'_{sc}$ ) an den genannten Messpunkten für die Kontrollgruppe (schwarz) und eine Stoffgruppe (rot).

### 2.4.3 Auswertung und Statistik

Die Berechnung des transepithelialen Widerstandes  $R_{te}$  und des äquivalenten Kurzschlussstromes  $I'_{sc}$  erfolgte nach dem Ohm'schen Gesetz ( $U = R \cdot I$ ):

Beide Parameter wurden auf die Fläche der Zellkultur bezogen, um sie mit Messungen aus der Literatur vergleichbar zu machen.

$$R_{te} = \frac{\Delta V_{te}}{I(Puls)} \times Fläche$$

Der äquivalente Kurzschlussstrom  $I'_{sc}$  ist ein Maß für den durch elektrogenen epithelialen Transport erzeugten Strom. Er wurde aus dem transepithelialen Widerstand  $R_{te}$  und dem transepithelialen Potential  $V_{te}$  der ermittelt.

$$I'_{sc} = \frac{V_{te}}{R_{te}}$$

Die Ergebnisse wurden in Form eines Säulendiagrammes als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

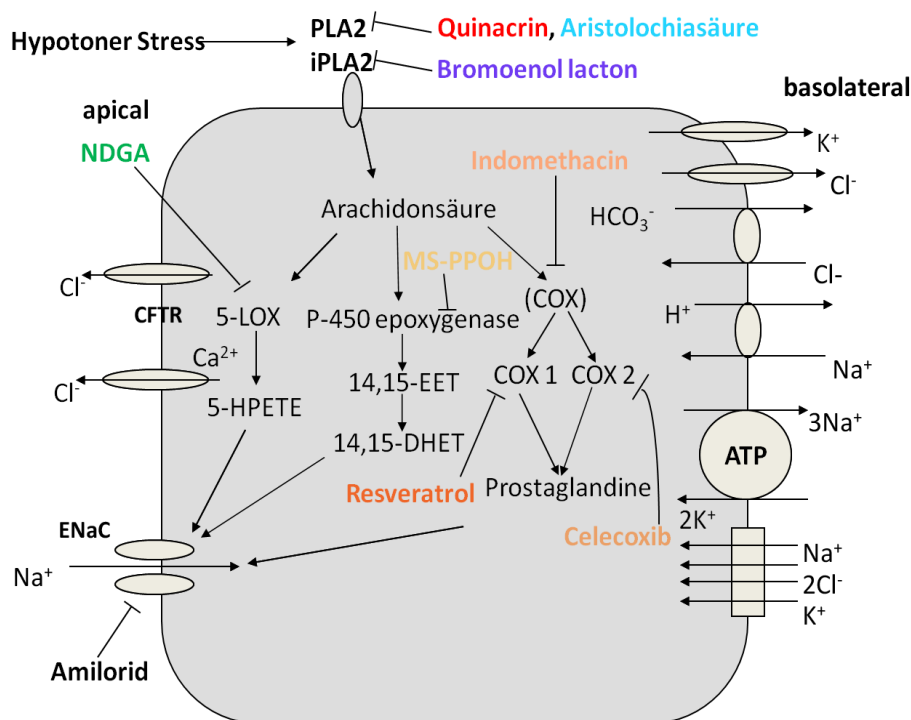
Alle Versuche mit Hemmstoffen sind ungepaart. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Software-Programm Excel.

Dabei wurde der Zweistichproben-t-Test für zwei ungepaarte Stichproben (d.h. immer eine ungepaarte Kontrolle pro Substanz) benutzt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $<5\%$  ( $p < 0,05$ ) wurde als Signifikanzschwelle gesetzt, was sowohl im Text, als auch in den Abbildungen mit einem Stern (\*) markiert wurde.

### 3 Ergebnisse

Die Rolle von PLA2 in der Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC) bei Änderung der Osmolalität wurde mit Hilfe von Inhibitoren der PLA2 und Inhibitoren der Enzyme, die PLA2-Metabolite erzeugen untersucht.

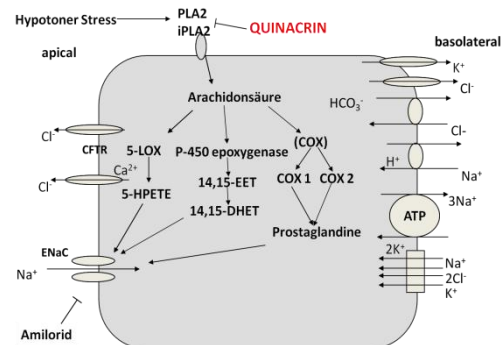


**Abb. 9:** Zellmodell mit den möglichen Angriffsorten für Inhibitoren der PLA2 und der Enzyme, die ihre verschiedenen Metabolite bilden.

Die Abbildung 9 zeigt die schematische Darstellung einer A6 Zelle mit den Angriffspunkten der in dieser Arbeit eingesetzten Hemmstoffe wie in Abbildung 5 bereits dargestellt. Die Wahl dieser Stoffe und die eingesetzte Konzentration für maximale Hemmung stützten sich auf die Fachliteratur. Ein entsprechender Ausschnitt aus dieser Abbildung ist den jeweiligen Abschnitten der Ergebnisse zur besseren Übersicht als kleine Skizze vorangestellt.

### 3.1 Hemmung der Phospholipase A<sub>2</sub>

#### Quinacrin



In den folgenden Experimenten wurde die hemmende Wirkung von Quinacrin (100  $\mu$ M) auf  $I_{sc}$  untersucht. Die Anzahl der Versuche war  $n = 7$  (Kontrollgruppe) und  $n = 6$  (Quinacrin-Gruppe). Die Dauer der Zellkultur zwischen Aussaat und Konfluenz war zwischen 9 und 17 Tage.

In Abbildung 10 ist die hemmende Wirkung von Quinacrin auf  $I_{sc}$  beim hypotonischen Stress dargestellt. Mit Hilfe von Quinacrin konnte die Aktivierung von  $I_{sc}$  durch hypotonischen Stress verhindert werden. Die Hemmung von  $I_{sc}$  durch Quinacrin war nach 30 min vollständig.

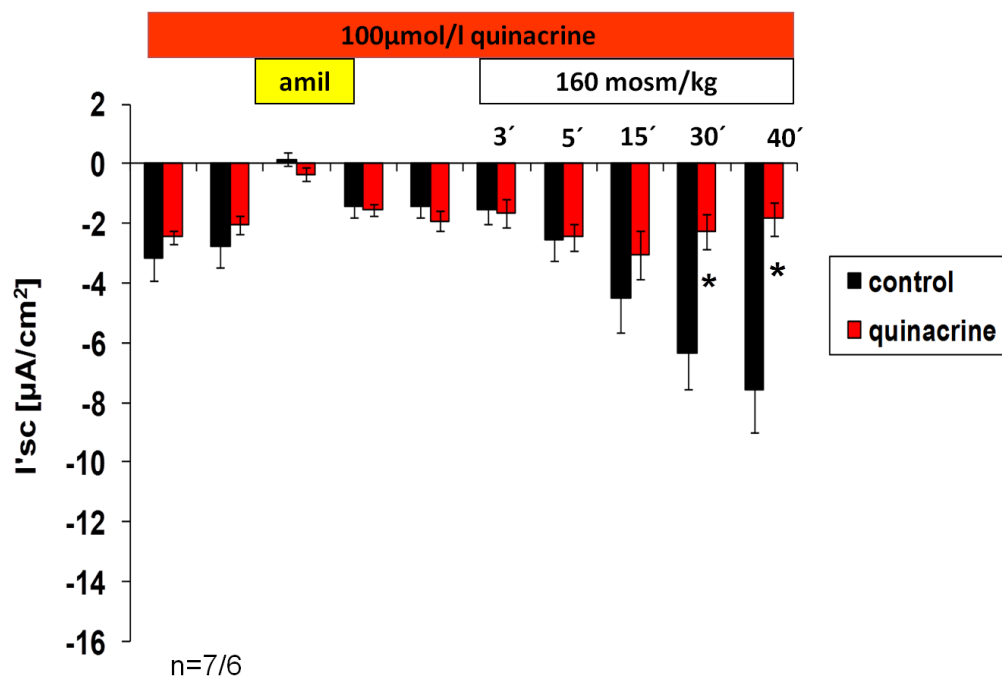
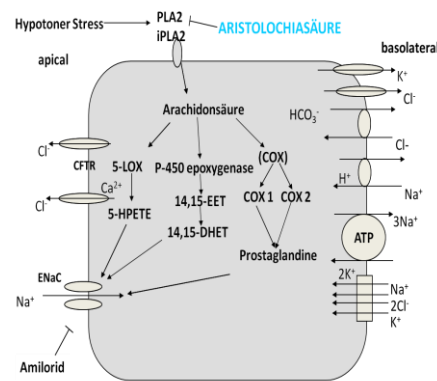
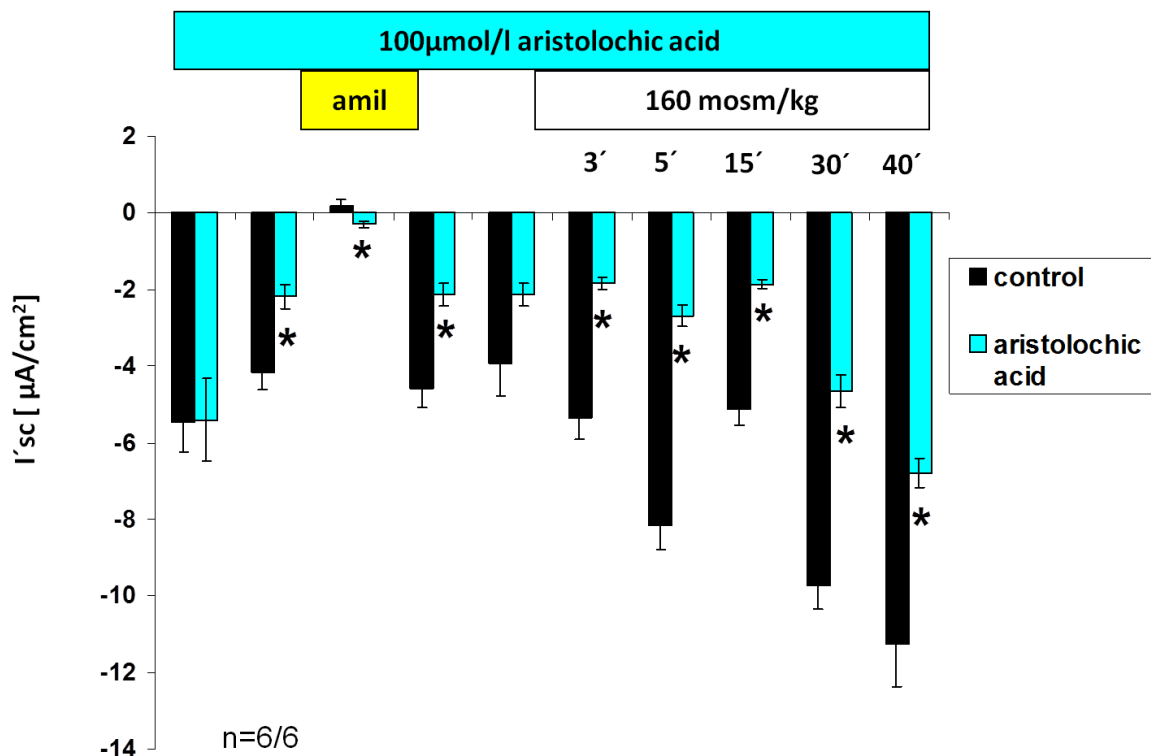


Abb. 10: Wirkung von Quinacrin auf  $I_{sc}$  beim hypotonischen Stress in A6-Zellen

## Aristolochiasäure

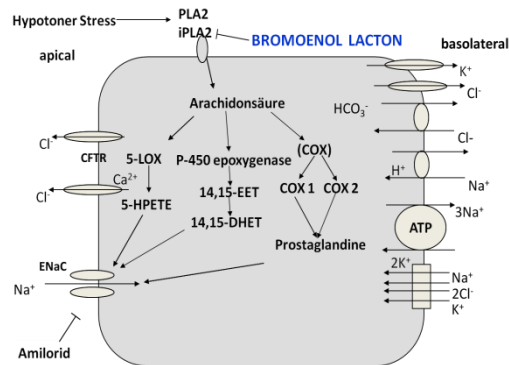


Aristolochiasäure ist ein weiterer PLA2 Hemmstoff und wurde ebenfalls in der Konzentration 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Anzahl der Versuche ist  $n = 6$  (Kontrollgruppe) und  $n = 6$  (Aristolochiasäure-Gruppe), die Dauer der Zellkultur zwischen Aussaat und Konfluenz war zwischen 12 und 19 Tage. Die Abbildung 11 zeigt die hemmende Wirkung von Aristolochiasäure auf  $I_{sc}$  im Laufe des hypotonischen Stress. Im Gegensatz zu Quinacrin hemmte Aristolochiasäure  $I_{sc}$  schon zu Beginn des hypotonischen Stress und auch in der Phase vorher. Allerdings entfaltet sich die hemmende Wirkung von Aristolochiasäure auf  $I_{sc}$  nach 30 min und 40 min nicht vollständig, wie es bei Quinacrin der Fall war.

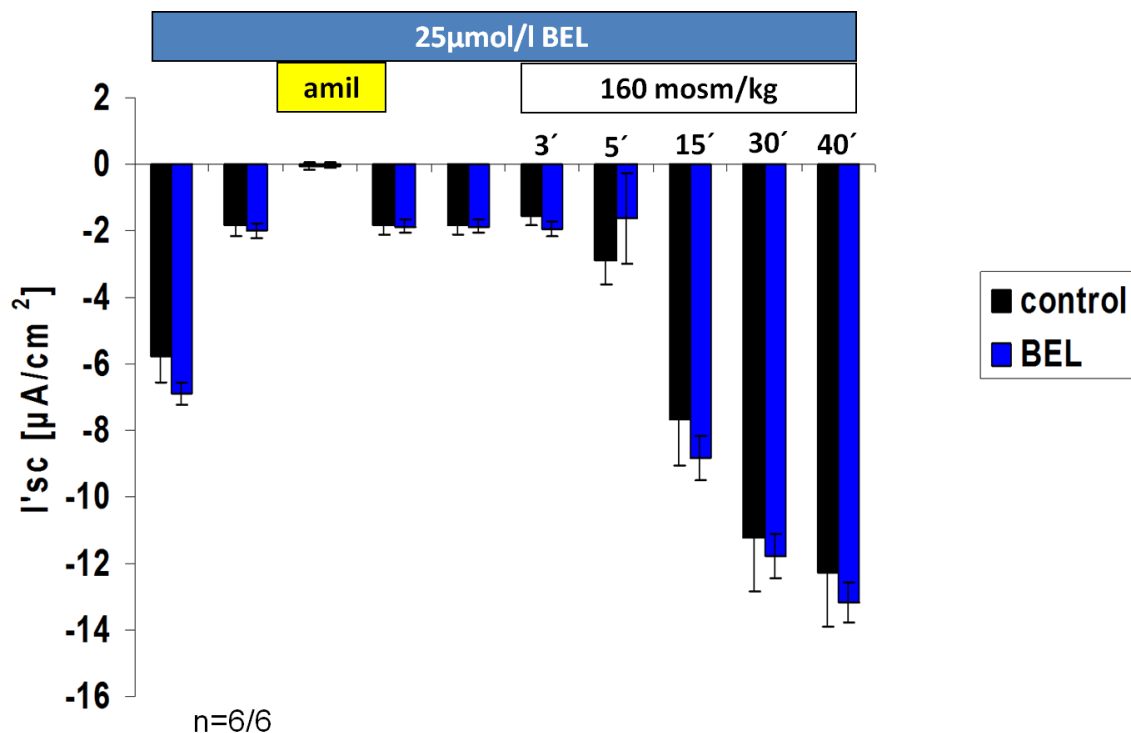


**Abb. 11:** Wirkung von Aristolochiasäure auf  $I_{sc}$  beim hypotonischen Stress in A6 Zellen

## Bromoenol lacton



Bromoenol lacton (BEL) ist ein Hemmstoff der calciumunabhängigen PLA2 (iPLA2). Die eingesetzte Konzentration von BEL betrug 25  $\mu\text{M}$ . Die Anzahl der Versuche ist  $n = 6$  (Kontrollgruppe) und  $n = 6$  (BEL-Gruppe). Die Kultivierung dauerte 14 Tage. Abbildung 12 zeigt die  $I_{sc}$  Werte der Experimente mit BEL. BEL hatte keine hemmende Wirkung auf den epithelialen Natriumkanal (ENaC) beim hypotonischen Stress.

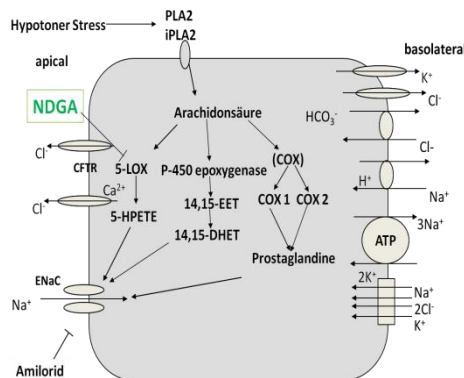


**Abb. 12:** Wirkung von Bromoenol lacton BEL auf  $I_{sc}$  beim hypotonischen Stress in A6 Zellen.



### 3.2 Hemmung der Arachidonat-5-Lipoxygenase

#### Nordihydroguajaretsäure (NDGA)



Mit Hilfe von NDGA wurde geprüft, ob Leukotriene einen Einfluss auf ENaC beim hypotonischen Stress haben. Die Anzahl der Versuche war  $n = 7$  (Kontrollgruppe) und  $n = 7$  (NDGA-Gruppe), die Dauer der Zellkultur zwischen Aussaat und Konfluenz war zwischen 11 und 18 Tage. Die Konzentration von NDGA betrug  $50 \mu\text{M}$ . Abbildung 13 zeigt die  $I_{sc}$  Werte der Experimente mit NDGA. Es hemmte  $I_{sc}$  partiell nach 15 min, 30 min und 40 min beim hypotonischen Stress. Aus der Versuchsreihe mit NDGA ist auf eine wichtige Rolle von Leukotrienen bei der Regulation von ENaC bei Änderung der Osmolalität zu schließen.

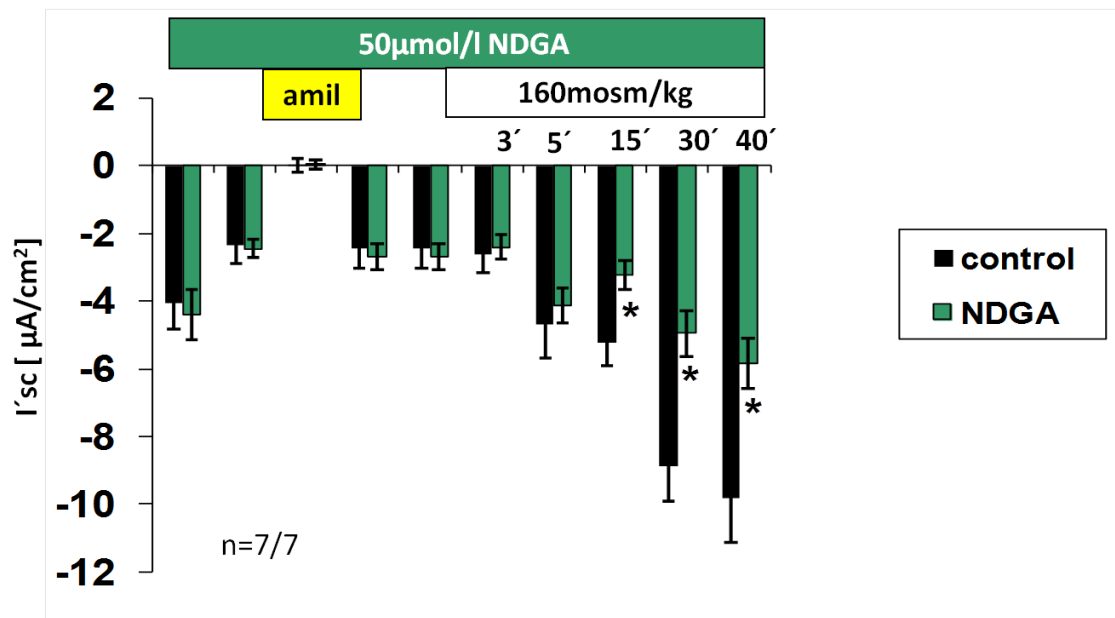
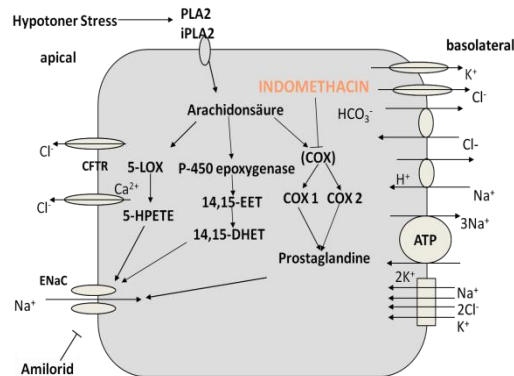


Abb. 13: Wirkung von NDGA auf  $I_{sc}$  beim hypotonischen Stress in A6-Zellen.

### 3.3 Hemmung der Cyclooxygenasen

#### Indomethacin



Indomethacin hemmt unspezifisch beide Subtypen der COX. Die Konzentration von Indomethacin betrug 50  $\mu\text{M}$ . Die Anzahl der Versuche variierte zwischen  $n = 6$  (Kontrollgruppe) und  $n = 7$  (Indomethacin-Gruppe), die Dauer der Zellkultur zwischen Aussaat und Konfluenz war zwischen 11 und 19 Tage. Abbildung 14 zeigt die  $I'_{sc}$  Werte der Experimente mit Indomethacin. Der Effekt von Indomethacin war nicht eindeutig. Indomethacin inhibierte  $I'_{sc}$  unter Kontrollbedingungen und nach 15 min, zeigte aber keinen signifikanten Effekt mehr nach 30 min und 40 min.

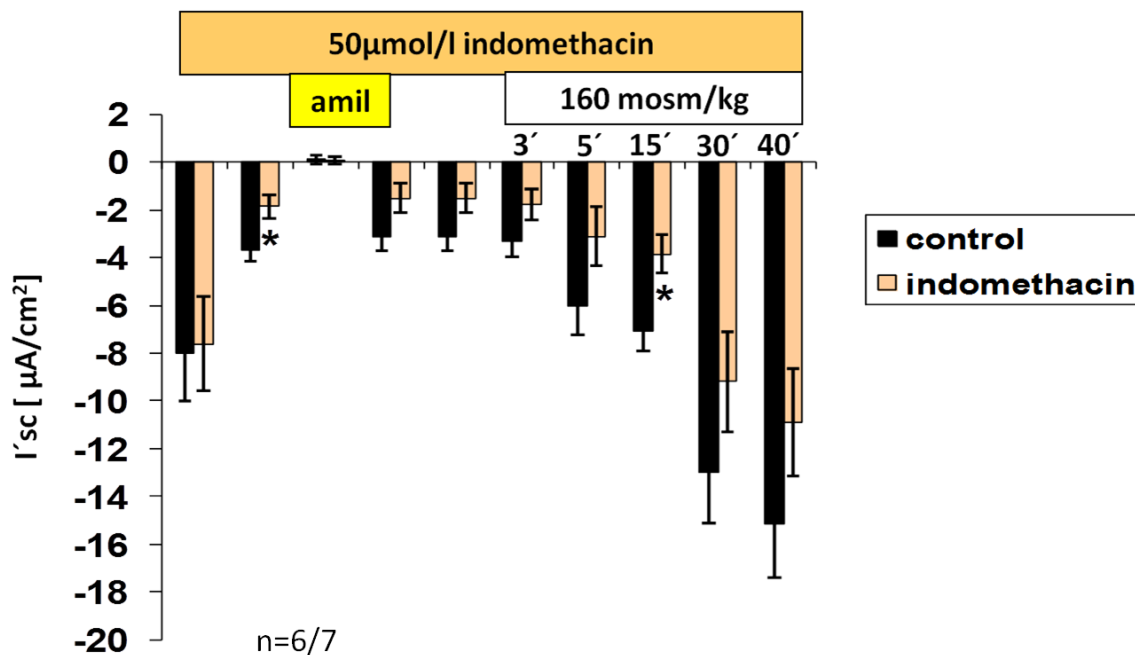
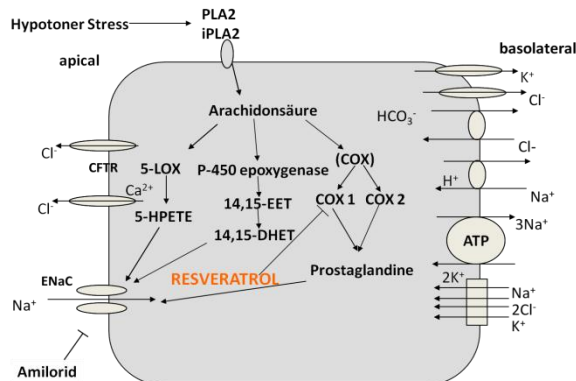


Abb. 14: Wirkung von Indomethacin auf  $I'_{sc}$  beim hypotonischen Stress in A6-Zellen.

## Resveratrol



Resveratrol hemmt die Cyclooxygenase 1 (COX 1). Die Anzahl der Versuche variierte zwischen  $n = 5$  (Kontrollgruppe) und  $n = 6$  (Resveratrol-Gruppe), die Dauer der Zellkultur zwischen Aussaat und Konfluenz war zwischen 11 und 12 Tage. Die Konzentration von Resveratrol betrug  $50 \mu\text{M}$ . Abbildung 15 zeigt die  $I_{sc}$  Werte der Experimente mit Resveratrol. Aus der Versuchsreihe ist die Hemmung von  $I_{sc}$  sowohl in isoosmolarer Kontrolllösung, als auch beim hypotonischen Stress eindeutig zu sehen.

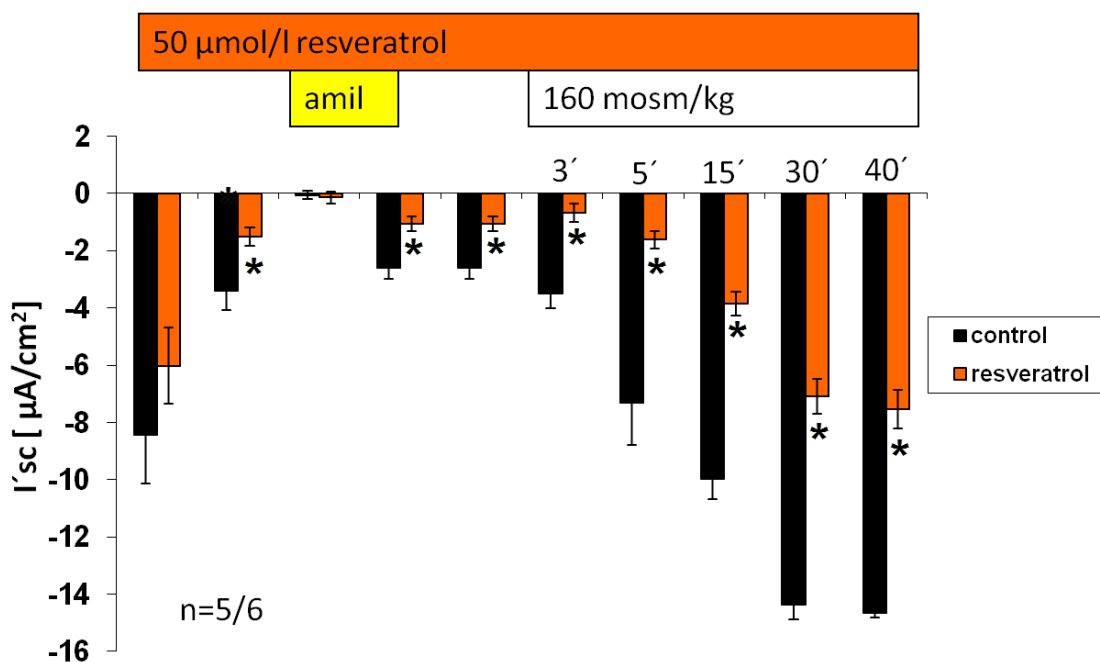
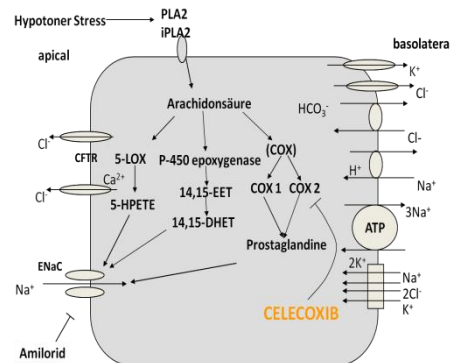
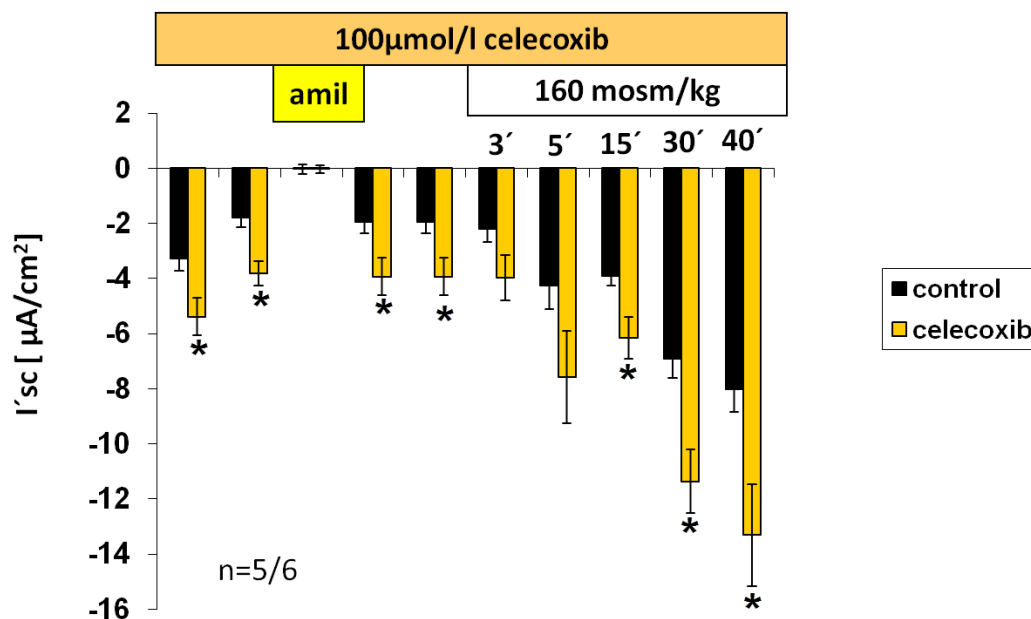


Abb. 15: Wirkung von Resveratrol auf  $I_{sc}$  beim hypotonischen Stress in A6-Zellen

## Celecoxib



Celecoxib ist ein Hemmstoff der Cyclooxygenase 2 (COX 2). Die Anzahl der Versuche variierte zwischen  $n = 5$  (Kontrollgruppe) und  $n = 6$  (Celecoxib-Gruppe), die Dauer der Zellkultur zwischen Aussaat und Konfluenz war zwischen 12 und 21 Tage. Die Konzentration von Celecoxib betrug  $50 \mu\text{M}$ . Abbildung 16 zeigt die  $I'_{sc}$  Werte der Experimente mit Celecoxib.

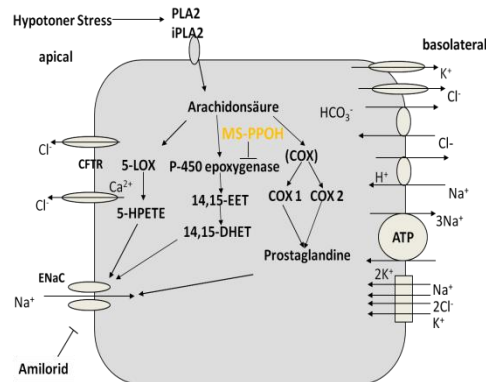


**Abb. 16:** Wirkung von Celecoxib auf  $I'_{sc}$  beim hypotonischen Stress in A6 Zellen

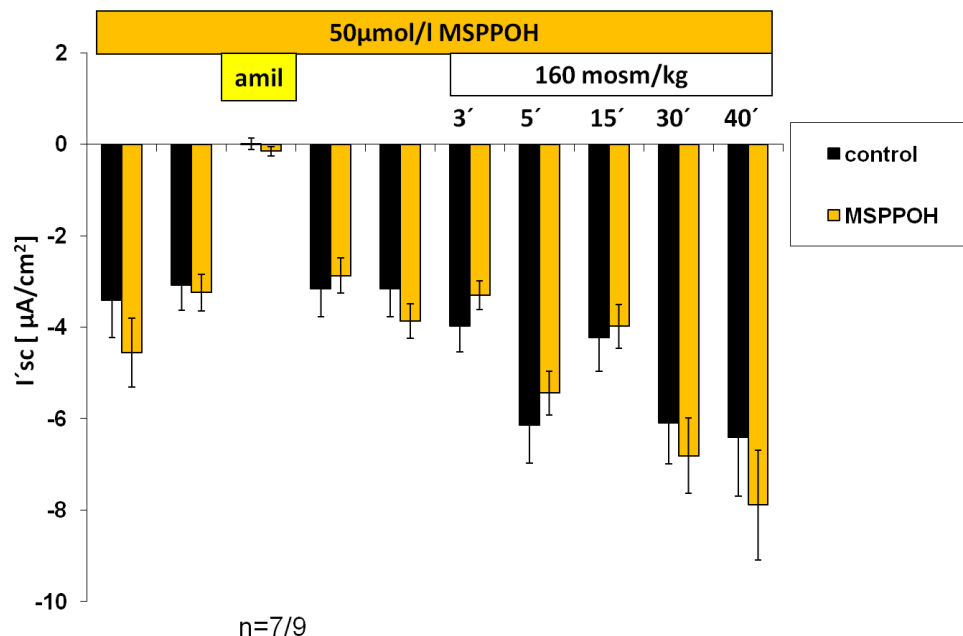
Erstaunlicherweise kam es zur Aktivierung von  $I'_{sc}$  durch Celecoxib sowohl in isoosmolarer Kontrolllösung, als auch beim hypotonischen Stress. Aus dieser Beobachtung ist auf eine differenzielle Beteiligung der COX bei der Regulation des epithelialen Natriumtransports zu schließen.

### 3.4 Hemmung der Cytochrom P450 Epoxygenase.

#### MS-PPOH



Mit Hilfe von MS-PPOH wurde schließlich die Beteiligung der Cytochrom P450 Epoxygenase an der ENaC Regulation überprüft. Die Anzahl der Versuche variierte zwischen  $n = 7$  (Kontrollgruppe) und  $n = 9$  (MS-PPOH-Gruppe), die Dauer der Zellkultur zwischen Aussaat und Konfluenz war zwischen 9 und 25 Tage. Die Konzentration von MS-PPOH betrug  $50 \mu\text{M}$ . Die Grafik in Abbildung 17 zeigt keinen Unterschied von  $I'_{sc}$  zwischen der Kontroll- und der Stoffgruppe.



**Abb. 17:** Wirkung von MS-PPOH auf  $I'_{sc}$  beim hypotonischen Stress in A6 Zellen

## 4 Diskussion

### 4.1 Schlussfolgerung aus den Experimenten.

Die Regulation des Natriumtransportes in Epithelzellen im Aldosteron-sensiblen distalen Nephron (ASDN) ist wichtig für die Aufrechterhaltung des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes. Der Natriumtransport durch ENaC im ASDN ist der limitierende Faktor für die Natriumaufnahme und die Blutdruckkontrolle (78). A6 Zellen wurden als einfach zu handhabendes Zellkultur-Modell des Sammelrohres gewählt. Sie haben viele funktionelle Ähnlichkeiten zum Sammelrohr in Bezug auf den epithelialen Natriumtransport und dieser kann zuverlässig experimentell stimuliert werden (8). Dies konnte am Beispiel von Quinacrin gezeigt werden. Es hemmte in A6-Zellen, wie bereits in der Literatur (19) beschrieben, den mit hypotonischem Stress induzierten  $I_{sc}$  vollständig, ohne die basale ENaC Aktivität zu beeinflussen. Bei den Versuchen mit Aristolochiasäure, dem spezifischen Inhibitor von cPLA2 (24;25), konnte nur eine partielle Hemmung von  $I_{sc}$  erreicht werden. Allerdings hemmte Aristolochiasäure den Natriumtransport sowohl im isotonischen Zustand, als auch im hypotonischen Stress.

Die Versuchsreihe mit Bromoenol lactone, dem Inhibitor der  $Ca^{2+}$ -unabhängigen PLA2 (iPLA2), hat gezeigt, dass nur die  $Ca^{2+}$ -abhängigen Typen der PLA2 bei der Regulation von ENaC beim hypotonischen Stress beteiligt sind.

In den Versuchen mit NDGA, dem spezifischen Inhibitor der Arachidonat-5-Lipoxygenase, konnte ich in meinen Experimenten eine  $I_{sc}$ -Hemmung 15, 30, und 40 min nach Beginn des hypotonischen Stress sehen. Die Hemmung mit NDGA hatte keinen Einfluss auf den Natriumtransport im isotonischen Zustand.

Die Versuchsreihe mit Indomethacin, dem Hemmstoff beider Cyclooxygenasen, lieferte kein eindeutiges Ergebnis. Indomethacin inhibierte vorübergehend den  $I_{sc}$  30 min nach Beginn des Experiments in isoosmolarer Lösung und 15 min nach Beginn des hypotonischen Stresses. Indomethacin zeigte am Ende aber keine Wirkung auf  $I_{sc}$  30 min und 40 min nach Beginn des hypotonischen Stress. Bei COX-1-Hemmung durch Resveratrol konnte man eine signifikante Hemmung von  $I_{sc}$  sowohl in der isoosmolaren, als auch in der hypotonischen Lösung beobachten. Dagegen konnte bei Hemmung von COX-2 durch Celecoxib sogar eine Aktivierung von  $I_{sc}$  in isoosmolarer und hypotonischer Lösung beobachtet werden. Die entgegengesetzte Wirkung von COX-1 und COX-2 Hemmung könnte die transiente und

inkonstante Wirkung von Indomethacin erklären, da sich Stimulation und Hemmung überlappen. Daraus folgend aktiviert COX-1, und COX-2 hemmt den Natriumtransport sowohl in isotonischer, als auch in hypotonischer Lösung.

In der Versuchsserie mit dem Cytochrome P450-Epoxygenase-Hemmstoff MSPPOH gab es in meiner Arbeit keinen signifikanten Unterschied von  $I_{sc}$  zwischen der Stoff- und der Kontrollgruppe. Es kann bedeuten, dass den EETs keine wesentliche Bedeutung bei der ENaC-Regulation in A6 Zellen zukommt.

Zusammenfassend ist über PLA2 und ihre Metabolite in der ENaC-Regulation beim hypotonischen Stress in A6 Zellen zu sagen:

- 1) Die  $Ca^{2+}$  abhängige PLA2 stellt Arachidonsäure bereit.
- 2) Der Leukotrienweg über 5-LO aktiviert den Natriumtransport.
- 3) Der Prostaglandinweg reguliert Natriumtransport differenziell. COX-1 aktiviert und COX-2 hemmt. Die Wirkung ist nicht auf den hypotonen Stress begrenzt, sondern findet auch in isoosmolarer Lösung statt.
- 4) Die Cytochrom P450-Epoxygenaseprodukte haben wahrscheinlich keinen wesentlichen Einfluss.
- 5) Da die Arachidonsäure in hemmende und aktivierende Wege divergiert, muss die Rückwirkung der Hemmung einzelner Wege auf die verfügbare Substratkonzentration für andere Wege berücksichtigt werden.

## 4.2 Hypothesen zur Rolle von MAP-Kinasen.

Es ist noch nicht vollständig geklärt, über welche Signalwege Natriumtransport bei niedriger Osmolalität in A6 Zellen reguliert wird. Durch osmotische Schwellung und mechanische Membranspannung werden Rezeptortyrosinkinasen (RTK) aktiviert (18). Niisato et al. (18) haben gezeigt, dass der Effekt von hypotonischer Lösung auf Natriumtransport in A6 Zellen ähnlich dem des ADH ist. Dabei wird die Anzahl von ENaC an der apikalen Membran und die Offenwahrscheinlichkeit von ENaC gesteigert (18). Der hypotonische Stress soll in A6 Zellen die RTK aktivieren (41). Jedoch ist noch nicht vollständig geklärt, welches Mitglied der MAP-Familie bei der Aktivierung des Natriumtransportes in A6 Zellen bei hypotonischem Stress beteiligt ist. Niisato et al. berichtet, dass der hypotonische Stress ENaC via p38-, ERK- und JNK-Signalwege aktiviert (79). Laut Taruno et al. sind nur JNK/SAPK

via Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)–Kaskade, aber nicht der ERK1/2–Signalweg bei der Aktivierung beteiligt (41).

Wie bereits in der Einleitung berichtet wurde, verläuft die Aktivierung des Natriumtransports beim hypotonischen Stress in zwei Phasen, der frühen nicht-genomischen und der späten genomischen Phase (16). Die frühe Phase des hypotonischen Stress, die mit der Aktivierung von JNK/SAPK verbunden ist, führt zur ENaC-Translokation und zum Einbau in die apikale Membran (16). In der späten, genomischen Phase, ca. 30 min nach Beginn des hypotonischen Stress, wird die Expression von SGK1-mRNA und allen drei Untereinheiten von ENaC angeregt (16). Die Expression von SGK1-mRNA ist mit dem PI3K-Signalweg verbunden (80). Laut Rozansky et al. spielt der PI3K-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Natriumtransports in A6 Zellen sowohl in der frühen, als auch in der späten Phase des hypotonischen Stress (80). PI3K kann ENaC einerseits über den PDK1/SGK1-Signalweg aktivieren (81). Dabei wird die ENaC-Ubiquitinierung, Internalisierung und der Abbau verhindert und die Anzahl von ENaC an der apikalen Membran erhöht (82). Andererseits können PIP2 und PIP3 direkt an ENaC binden und durch Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit den Natriumtransport aktivieren (83). Zum einen haben Markadieu et al. (84) in A6 Zellen gezeigt, dass ENaC über den EGFR/PI3K-Signalweg aktiviert wird. MAP-Kinasen wie ERK1/2 hemmen EGFR und dadurch auch den Natriumtransport (84).

Zusammengefasst spielen MAP-Kinasen und PI3K-Signalweg eine wichtige Rolle in der Regulation des Natriumtransportes in A6 Zellen beim hypotonischen Stress.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen spielen eine wichtige Rolle in der genomischen Phase des hypotonischen Stresss (16). In A6 Zellen beobachtete man bei Zellschwellung, als Antwort auf die mechanische Dehnung der Zellmembran, einen transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Anstieg (85). Zum anderen haben Matsumoto et al. (19) gezeigt, dass die PLA2 und ihre Metabolite, bzw.  $\text{PGE}_2$  den Natriumtransport in A6 Zellen beim hypotonischen Stress regulieren.  $\text{PGE}_2$  aktiviert den Natriumtransport über den cAMP/PKA Signalweg (19). Durch Quinacrin, dem unspezifischen Inhibitor der PLA2, oder Indomethacin, dem COX1/COX2-Hemmstoff, wird  $I_{\text{sc}}$  beim hypotonischen Stress in A6 Zellen signifikant reduziert (19). Dagegen zeigte Worrell et al. (24) eine hemmende Wirkung von Arachidonsäure auf ENaC und eine aktivierende von  $\text{PGE}_2$ .

Während ich mit Quinacrin eine komplette Hemmung von  $I_{\text{sc}}$  beim hypotonischen Stress in A6-Zellen erreichen konnte, bewirkte Aristolochiasäure sowohl im isotonischen Zustand, als auch in hypotonischen Stress nur eine partielle Hemmung von  $I_{\text{sc}}$ . Im Gegensatz zu Matsumoto et al. (19) lieferte meine Versuchsreihe mit Indomethacin keine eindeutigen



Ergebnisse. 30 min nach Beginn des Experiments (d.h. in isoosmolarer Lösung) sowie 15 min nach Beginn des hypotonischen Stress inhibierte Indomethacin  $I_{sc}$  nur vorübergehend. Indomethacin hatte keine Wirkung auf  $I_{sc}$  30 min und 40 min nach Beginn des hypotonischen Stress. Dabei beobachtete Matsumoto et al. (19) einen  $I_{sc}$ -Anstieg von  $20 \mu A/cm^2$  in isotonischer Lösung und bis zu  $39 \mu A/cm^2$  im hypotonischen Stress (19). In meinen Experimenten steigerte sich  $I_{sc}$  von  $-2,6 \mu A/cm^2$  bis auf  $-14,7 \mu A/cm^2$ . Die nicht eindeutigen Ergebnisse mit Indomethacin könnten durch unterschiedliche Ausgangsbedingungen oder durch eine entgegengesetzte Wirkung von COX1/COX2 und 5-LO erklärt werden.

Laut Cantiello et al. (70) aktiviert 5-LO bzw. LTD4 ENaC in A6 Zellen in isotonischer Lösung durch Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit und der Anzahl in der apikalen Membran. In meinen Versuchen zeigte NDGA, der spezifische Inhibitor von 5-LO keine Wirkung auf den Natriumtransport in isotonischer Lösung. Die Wirkung von NDGA setzte erst in hypotonischer Lösung jedoch bereits während des RVD ein.

### **4.3 Mögliche Signalwege der Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC) via PLA2 und ihrer Metabolite bei niedriger Osmolalität in unterschiedlichen Zellsystemen**

ENaC wird durch die Änderung der Offenwahrscheinlichkeit und der Anzahl der leitfähigen Kanäle in der apikalen Membrane reguliert (1). In vielen ENaC-exprimierenden Epitheltypen ist die schnelle Aktivierung des Natriumtransportes durch ADH via cAMP/PKA-Signalweg bedingt (86). Es wird diskutiert, ob ADH den Natriumtransport durch Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit oder Anzahl in der apikalen Membran aktiviert (87). Bei wiederholter Stimulation des kortikalen Abschnittes des Sammelrohrs (CCD) der Maus mit Forskolin, einem direkten cAMP-Stimulator, beobachtet man eine Steigerung der ENaC-Anzahl in der apikalen Membran. Die Steigerung der ENaC-Anzahl ist durch den Einbau neuer Kanäle aus dem intrazellulären Speicher bedingt (88). In A6 Zellen aktiviert der cAMP/PKA-Signalweg den Natriumtransport durch Erhöhung der ENaC-Anzahl in der apikalen Membran (89).

Wie PLA2 den Natriumtransport beim hypotonischen Stress aktiviert, ist nicht vollständig geklärt. MAP-Kinasen sollen eine Schlüsselrolle beim PLA2-Signalweg beim hypotonischem Stress spielen (59;63). In Makrophagen wird cPLA2 via ERK und p38 - Signalweg aktiviert

(90). In menschlichen Thrombozyten führt die Aktivierung von SAPKs zu Freisetzung von Arachidonsäure durch cPLA2 (91).

Der hypotonische Stress führt zum Verlust von Elektrolyten, wie  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$  und zum Schrumpfen der Zelle (15). Eine niedrigere intrazelluläre Chloridionen-Konzentration in den Zellen der Macula densa stimuliert die COX-2-Expression und die  $\text{PGE}_2$  Freisetzung über den ERK1/2 und p38 Signalweg (20). In A6 Zellen aktiviert die niedrige Chloridionen-Konzentration den Natriumtransport (92).

Zusammenfassend werden folgende Signalwege beim hypotonischen Stress aktiviert: Die niedrige intrazelluläre Chloridionen-Konzentration führt zur Aktivierung des RTK-JNK/SAPK-P3K-PDK-Signalweges (41;80). Parallel dazu wird cPLA2 via ERK und p38-Signalweg aktiviert (20;90).

Auch die mechanische Membrandehnung bei Zellschwellung könnte PLA2 via ERK1/2 Signalweg aktivieren (93). Die mechanische Membrandehnung bei Zellschwellung stimuliert den Natriumtransport durch Aktivierung des EGF-Rezeptors (84). Jedoch dürfen erst vorsichtige Aussagen über den Effekt von Prostaglandinen auf den Natriumtransport gemacht werden. Im Allgemeinen wurde berichtet, dass Prostaglandine den Natrium- und Wassertransport im Sammelrohr hemmen (94).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wird die unterschiedliche Wirkung von Prostaglandinen auf den Natriumtransport durch verschiedene Prostaglandinrezeptoren EP1-EP4 bedingt (66).

Dies kann bedeuten, dass COX-1 Produkte ENaC über den EP4-Prostaglandinrezeptor (cAMP/PKA Signalweg) aktiviert. Dagegen hemmen COX-2 Produkte den Natriumtransport über EP1- oder EP3-Prostaglandinrezeptoren. Allerdings setzt dies eine räumliche Trennung der Stoffwechselwege in der Zelle voraus.

Die, über Cytochrom P450-Epoxygenasen entstehende, 11,12-EET inhibiert den Natriumtransport in den Zellen des kortikalen Abschnittes des Sammelrohrs der Ratte (95). Wei et al. (95) hat vorgeschlagen, dass Arachidonsäure den Natriumtransport via 11,12-EET hemmt. Im kortikalen Sammelrohr wirken EETs, insbesondere 11,12-EET, auf den Natriumtransport über Triebkraft der basolateralen  $\text{K}^+$ -Kanäle (76).

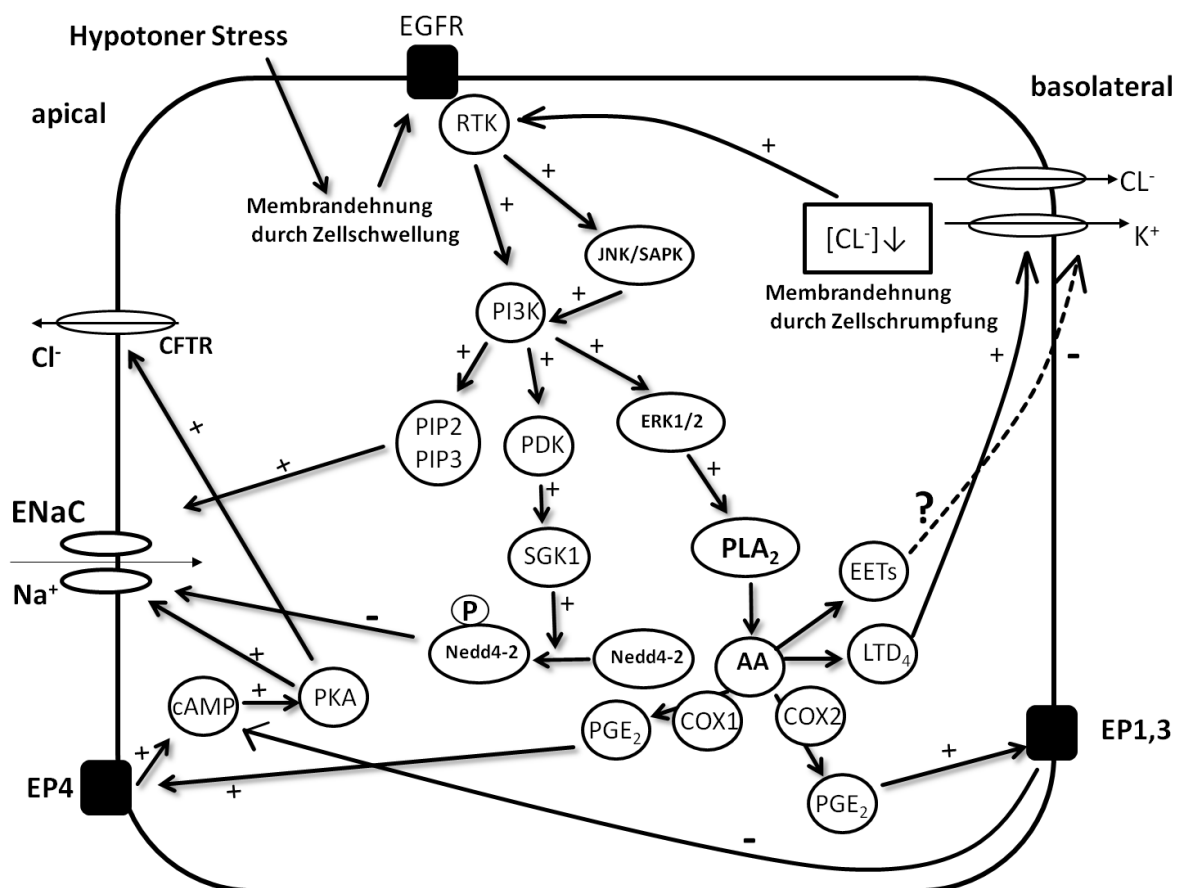
In den Versuchen mit A6 Zellen konnte keine signifikante Wirkung der Hemmung von EET Produktion auf den Natriumtransport beim hypotonischen Stress gesehen werden.

Durch 5-LO aus Arachidonsäure entstehendes LTD<sub>4</sub> spielt eine wichtige Rolle bei der RVD und beim K<sup>+</sup>-Ionen-Verlust in EAT-Zellen (63). 5-LO wirkt über ERK1/2 und p38 Signalweg (63). In A6 Zellen aktivieren Leukotriene den Natriumtransport (70). In meinen Experimenten konnte 5-LO ENaC nur in der hypotonischen Lösung aktivieren, dann bereits während der RVD.

Das Ergebnis aus der Versuchsreihe mit NDGA führte mich zur Schlussfolgerung, dass noch andere Metabolite der PLA<sub>2</sub> an der Regulation von ENaC beteiligt sein müssen.

Der Prozess der Regulation des Natriumtransportes beim hypotonischen Stress ist äußerst komplex und bedarf weiterer Untersuchungen.

Abbildung 18 zeigt den Versuch, die aktuelle Literatur bezüglich der ENaC Regulation in das Modell der A6 Zelle zu übertragen.



**Abb. 18:** Mögliche Signalwege in der Regulation von ENaC beim hypotonischen Stress in der A6-Zelle. Mechanische Membrandehnung bei der Zellschwellung führt zur Aktivierung des EGF-Rezeptors, der zu den Rezeptortyrosinkinasen (RTK) gehört. Der EGF-Rezeptor aktiviert die PI3K-Kaskade entweder direkt oder über JNK/SAPK. PI3K kann ENaC einerseits über den PDK1/SGK1-Signalweg aktivieren, andererseits können PIP2 und PIP3 direkt ENaC binden und durch Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit den Natriumtransport aktivieren. PI3K kann PLA<sub>2</sub> via ERK1/2 aktivieren. PLA<sub>2</sub> setzt Arachidonsäure frei. Über COX-1 katalysiert entsteht aus Arachidonsäure PGE<sub>2</sub> und bindet an den EP4-Prostaglandinrezeptor und aktiviert ENaC via

cAMP/PKA-Signalweg. PKA kann entweder direkt ENaC durch Phosphorylierung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC-Untereinheiten aktivieren oder PKA stimuliert den Natriumchloridtransport durch die Aktivierung des luminalen CFTR-Chloridkanals. Katalysiert über COX-2 entsteht aus Arachidonsäure PGE<sub>2</sub> und bindet an den EP1- und EP3-Prostaglandinrezeptor und hemmt ENaC. Der EP1-Prostaglandinrezeptor wirkt via IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>/PKC-Signalweg. Der EP3-Prostaglandinrezeptor führt als Gi-Protein-gekoppelter Rezeptor zum Abfall von cAMP. Über 5-LO entsteht aus Arachidonsäure LTD<sub>4</sub> und aktiviert den basolateralen Kaliumkanal, der die elektrische Triebkraft für den Natriumtransport erzeugt. Es wird vermutet, dass EETs, insbesondere 11,12-EET, Natriumtransport durch Hemmung der basolateralen K<sup>+</sup>-Kanäle vermindert. Eine niedrige intrazelluläre Chloridionen-Konzentration bei Schwellung führt zu Aktivierung des RTK-JNK/SAPK-P3K-PDK-Signalweges und wäre damit ein positiver Rückkopplungsfaktor für die Natriumchloridaufnahme in die Zelle.

## 5 Zusammenfassung

Die Regulation des Natriumtransportes durch den epithelialen Natriumkanal (ENaC) im Aldosteron-sensiblen distalen Nephron ist der limitierende Faktor für die Natriumaufnahme und Blutdruckkontrolle. Bei Entgleisung dieses Prozesses kann es zu schwerwiegenden Störungen des Salz-Wasser-Haushaltes kommen. Der Natriumstrom durch ENaC unterliegt unterschiedlichen regulatorischen Systemen. Sie steuern ENaC durch Änderung der Offenwahrscheinlichkeit, Anzahl der Kanäle und ihrer Leitfähigkeit. Darüber hinaus kann auch indirekt die elektrische Triebkraft für den Strom beeinflusst werden. Die Phospholipase A2 (PLA2) und ihre Metabolite spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von ENaC. Diese Rolle wurde in der vorliegenden Arbeit an A6 Zellkulturen untersucht, welche funktionelle Ähnlichkeit mit den Hauptzellen des Sammelrohrs von Säugern aufweisen. Dabei wurde der Natriumstrom durch ENaC sowohl unter isotonen Bedingungen, als auch nach Stimulation durch hypotonen Stress gemessen. Die hypotone Stimulation in A6 Zellen soll dabei eine entsprechende funktionelle oder hormonelle Aktivierung von ENaC in der Niere simulieren.

Die Messungen wurden mit Hilfe der Ussing-Kammer an konfluenten Zellkulturen auf permeablen Filtern an jeweils einer Kontroll- und einer Experimentalgruppe durchgeführt. Nach 30min Adaptationszeit wurde die isoosmolare Kontrolllösung (260 mosmol/kg) durch hypoosmolare Kontrolllösung (160 mosmol/kg) ausgetauscht. In der Experimentalgruppe wurden zusätzlich Hemmstoffe der PLA2 (Quinacrin, BEL, Aristolochiasäure), der COX1/2 (Indomethacin, Resveratrol, Celecoxib), der 5-LO (NDGA) und der Cytochrom P450-Epoxygenase (MSPPOH) zugefügt. Der äquivalente Kurzschlussstrom  $I_{sc}$  wurde zuvor und 3, 5, 15, 30, und 40 min nach dem hypotonischen Stress ermittelt. Dabei ergaben sich folgende Beobachtungen für die Aktivierung des Natriumtransportes: cPLA2, nicht aber iPLA2, war beteiligt. Die 5-LO abhängige Stimulation erfolgte verzögert (>15 min). Die spezifische COX1/2 Hemmung wirkte unterschiedlich und bereits unter isotonen Bedingungen. ENaC wurde dabei COX1 abhängig aktiviert und COX2 abhängig gehemmt. Hemmung der Cytochrom P450-Epoxygenase hatte keinen Einfluss.

Die Daten verdeutlichen die Komplexität der Steuerung von ENaC durch Metabolite der PLA2 und legen nahe, bei pharmakologischen Eingriffen in diese Stoffwechselwege auf Störungen des Salz-Wasserhaushaltes und des Blutdrucks zu achten.

# Literaturverzeichnis

## Reference List

- (1) Marunaka Y. Hormonal and osmotic regulation of NaCl transport in renal distal nephron epithelium. *Jpn J Physiol* 1997 Dec;47(6):499-511.
- (2) Loffing J, Zecevic M, Feraille E, Kaissling B, Asher C, Rossier BC, et al. Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001 Apr;280(4):F675-F682.
- (3) Marunaka Y, Niisato N, Taruno A, Ohta M, Miyazaki H, Hosogi S, et al. Regulation of epithelial sodium transport via epithelial Na<sup>+</sup> channel. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:978196.
- (4) Rossier BC. The epithelial sodium channel: activation by membrane-bound serine proteases. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1(1):4-9.
- (5) Rossier BC, Pradervand S, Schild L, Hummler E. Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annu Rev Physiol* 2002;64:877-97.
- (6) Alvarez de la Rosa D, Canessa CM, Fyfe GK, Zhang P. Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol* 2000;62:573-94.
- (7) Jans D, Simaels J, Lariviere E, Steels P, Van DW. Extracellular Ca<sup>2+</sup> regulates the stimulation of Na<sup>+</sup> transport in A6 renal epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004 Oct;287(4):F840-F849.
- (8) Matsumoto PS, Ohara A, Duchatelle P, Eaton DC. Tyrosine kinase regulates epithelial sodium transport in A6 cells. *Am J Physiol* 1993 Jan;264(1 Pt 1):C246-C250.
- (9) Zeiske W, Atia F, Van DW. Apical Cl<sup>-</sup> channels in A6 cells. *J Membr Biol* 1998 Dec 1;166(3):169-78.
- (10) Boron WF, Boulpaep EL. Medical Physiology. In: Saunders Elsevier, editor. 2 ed. 2009. p. 142.
- (11) Niisato N, Marunaka Y. Cross talk of bumetanide-sensitive and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-dependent transporters activated by IBMX in renal epithelial A6 cells. *J Membr Biol* 1997 May 1;157(1):53-61.
- (12) Klinker R, Pape H-C, Silbernagl S. Die Funktion der Nieren. Physiologie. 5 ed. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag; 2005. p. 348.
- (13) Granitzer M, Leal T, Nagel W, Crabbe J. Apical and basolateral conductance in cultured A6 cells. *Pflugers Arch* 1991 Jan;417(5):463-8.
- (14) Hazama A, Okada Y. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of volume-regulatory K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in cultured human epithelial cells. *J Physiol* 1988 Aug;402:687-702.
- (15) Yu WG, Sokabe M. Hypotonically induced whole-cell currents in A6 cells: relationship with cell volume and cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>. *Jpn J Physiol* 1997 Dec;47(6):553-65.
- (16) Taruno A, Niisato N, Marunaka Y. Intracellular calcium plays a role as the second messenger of hypotonic stress in gene regulation of SGK1 and ENaC in renal epithelial A6 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 Jan;294(1):F177-F186.
- (17) Ji HL, Fuller CM, Benos DJ. Osmotic pressure regulates alpha beta gamma-rENaC expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1998 Nov;275(5 Pt 1):C1182-C1190.

- (18) Niisato N, Van DW, Liu M, Marunaka Y. Involvement of protein tyrosine kinase in osmoregulation of Na(+) transport and membrane capacitance in renal A6 cells. *J Membr Biol* 2000 May 1;175(1):63-77.
- (19) Matsumoto PS, Mo L, Wills NK. Osmotic regulation of Na<sup>+</sup> transport across A6 epithelium: interactions with prostaglandin E2 and cyclic AMP. *J Membr Biol* 1997 Nov 1;160(1):27-38.
- (20) Yang T, Park JM, Arend L, Huang Y, Topaloglu R, Pasumathy A, et al. Low chloride stimulation of prostaglandin E2 release and cyclooxygenase-2 expression in a mouse macula densa cell line. *J Biol Chem* 2000 Dec 1;275(48):37922-9.
- (21) Torres KJ, Reyes-Teran G, Sotelo J, Jung-Cook H, guirre-Cruz L. Influence of quinacrine and chloroquine on the in vitro 3'-azido-3'-deoxythymidine antiretroviral effect. *AIDS Res Ther* 2015;12:7.
- (22) Meltzer E, Lachish T, Schwartz E. Treatment of giardiasis after nonresponse to nitroimidazole. *Emerg Infect Dis* 2014 Oct;20(10):1742-4.
- (23) Sagara D, Unno N, Yamamoto N, Suzuki M, Nishiyama M, Tanaka H, et al. Trans-Serosal Leakage of Proinflammatory Mediators during Abdominal Aortic Aneurysm Repair: Role of Phospholipase A2 in Activating Leukocytes. *Ann Vasc Dis* 2010;3(2):131-9.
- (24) Worrell RT, Bao HF, Denson DD, Eaton DC. Contrasting effects of cPLA2 on epithelial Na<sup>+</sup> transport. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 Jul;281(1):C147-C156.
- (25) Carattino MD, Hill WG, Kleyman TR. Arachidonic acid regulates surface expression of epithelial sodium channels. *J Biol Chem* 2003 Sep 19;278(38):36202-13.
- (26) Ardalan MR, Khodaie L, Nasri H, Jouyban A. Herbs and hazards: risk of aristolochic acid nephropathy in Iran. *Iran J Kidney Dis* 2015 Jan;9(1):14-7.
- (27) Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA. Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol Rev* 2006 Sep;58(3):591-620.
- (28) Paliege A, Roeschel T, Neymeyer H, Seidel S, Kahl T, Daigeler AL, et al. Group VIA phospholipase A2 is a target for vasopressin signaling in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012 Apr 1;302(7):F865-F874.
- (29) Ali T, Kokotos G, Magrioti V, Bone RN, Mobley JA, Hancock W, et al. Characterization of FKGGK18 as inhibitor of group VIA Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 (iPLA2beta): candidate drug for preventing beta-cell apoptosis and diabetes. *PLoS One* 2013;8(8):e71748.
- (30) Peters-Golden M. Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 Jun;157(6 Pt 2):S227-S231.
- (31) Guzman-Beltran S, Pedraza-Chaverri J, Gonzalez-Reyes S, Hernandez-Sanchez F, Juarez-Figueroa UE, Gonzalez Y, et al. Nordihydroguaiaretic acid attenuates the oxidative stress-induced decrease of CD33 expression in human monocytes. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:375893.
- (32) Hammamieh R, Sumaida D, Zhang X, Das R, Jett M. Control of the growth of human breast cancer cells in culture by manipulation of arachidonate metabolism. *BMC Cancer* 2007;7:138.
- (33) Ferguson S, Hebert RL, Laneuville O. NS-398 upregulates constitutive cyclooxygenase-2 expression in the M-1 cortical collecting duct cell line. *J Am Soc Nephrol* 1999 Nov;10(11):2261-71.
- (34) Emminger H, Kia T. Nicht-Opioid-Analgetika. In: Haas W, editor. *Exaplan*. 7 ed. München: Urban&Fischer, Elsevier; 2011. p. 853-8.

- (35) Ma T, Tan MS, Yu JT, Tan L. Resveratrol as a therapeutic agent for Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2014;2014:350516.
- (36) Candelario-Jalil E, de Oliveira AC, Graf S, Bhatia HS, Hull M, Munoz E, et al. Resveratrol potentially reduces prostaglandin E2 production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *J Neuroinflammation* 2007;4:25.
- (37) Vio CP, Quiroz-Munoz M, Cuevas CA, Cespedes C, Ferreri NR. Prostaglandin E2 EP3 receptor regulates cyclooxygenase-2 expression in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012 Aug 1;303(3):F449-F457.
- (38) Elrod HA, Yue P, Khuri FR, Sun SY. Celecoxib antagonizes perifosine's anticancer activity involving a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Mol Cancer Ther* 2009 Sep;8(9):2575-85.
- (39) Williams JM, Sharma M, Anjaiah S, Falck JR, Roman RJ. Role of endogenous CYP450 metabolites of arachidonic acid in maintaining the glomerular protein permeability barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007 Aug;293(2):F501-F505.
- (40) Deborah Baines. Kinases as Targets for ENaC Regulation. *Current Molecular Pharmacology* 2013 Mar 1;6(1):50-64.
- (41) Taruno A, Niisato N, Marunaka Y. Hypotonicity stimulates renal epithelial sodium transport by activating JNK via receptor tyrosine kinases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007 Jul;293(1):F128-F138.
- (42) Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995 Jun;9(9):726-35.
- (43) Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001 Apr;22(2):153-83.
- (44) Bezniakow N, Gos M, Obersztyn E. The RASopathies as an example of RAS/MAPK pathway disturbances - clinical presentation and molecular pathogenesis of selected syndromes. *Dev Period Med* 2014 Jul;18(3):285-96.
- (45) Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002 Mar;12(1):9-18.
- (46) Yang Y, Kim SC, Yu T, Yi YS, Rhee MH, Sung GH, et al. Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm* 2014;2014:352371.
- (47) Carnero A, Paramio JM. The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, Cancer Mouse Models. *Front Oncol* 2014;4:252.
- (48) Edlind MP, Hsieh AC. PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian J Androl* 2014 May;16(3):378-86.
- (49) Lang F, Shumilina E. Regulation of ion channels by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *FASEB J* 2013 Jan;27(1):3-12.
- (50) Chan CH, Jo U, Kohrman A, Rezaeian AH, Chou PC, Logothetis C, et al. Posttranslational regulation of Akt in human cancer. *Cell Biosci* 2014;4(1):59.
- (51) Paplomata E, O'Regan R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol* 2014 Jul;6(4):154-66.
- (52) Klinker R, Pape H-C, Silbernagl S. Die Zelle als Grundbaustein. *Physiologie*. 5 ed. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag; 2005. p. 36-9.



- (53) Malik B, Price SR, Mitch WE, Yue Q, Eaton DC. Regulation of epithelial sodium channels by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006 Jun;290(6):F1285-F1294.
- (54) Schafer JA. Abnormal regulation of ENaC: syndromes of salt retention and salt wasting by the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002 Aug;283(2):F221-F235.
- (55) Rababa'h A, Singh S, Suryavanshi SV, Altarabsheh SE, Deo SV, McConnell BK. Compartmentalization Role of A-Kinase Anchoring Proteins (AKAPs) in Mediating Protein Kinase A (PKA) Signaling and Cardiomyocyte Hypertrophy. *Int J Mol Sci* 2014;16(1):218-29.
- (56) Pavlov TS, Ilatovskaya DV, Levchenko V, Mattson DL, Roman RJ, Staruschenko A. Effects of cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid on the epithelial sodium channel (ENaC). *Am J Physiol Renal Physiol* 2011 Sep;301(3):F672-F681.
- (57) Rajagopal M, Thomas SV, Kathpalia PP, Chen Y, Pao AC. Prostaglandin E2 induces chloride secretion through crosstalk between cAMP and calcium signaling in mouse inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014 Feb 1;306(3):C263-C278.
- (58) Ma HP, Chou CF, Wei SP, Eaton DC. Regulation of the epithelial sodium channel by phosphatidylinositides: experiments, implications, and speculations. *Pflugers Arch* 2007 Oct;455(1):169-80.
- (59) Lambert IH, Pedersen SF, Poulsen KA. Activation of PLA2 isoforms by cell swelling and ischaemia/hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)* 2006 May;187(1-2):75-85.
- (60) Bonventre JV. The 85-kD cytosolic phospholipase A2 knockout mouse: a new tool for physiology and cell biology. *J Am Soc Nephrol* 1999 Feb;10(2):404-12.
- (61) Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002 Aug;68-69:3-58.
- (62) Camara-Lemarroy CR, Gonzalez-Moreno EI, Guzman-de la Garza FJ, Fernandez-Garza NE. Arachidonic acid derivatives and their role in peripheral nerve degeneration and regeneration. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:168953.
- (63) Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 2009 Jan;89(1):193-277.
- (64) Wang S, Meng F, Xu J, Gu Y. Effects of lipids on ENaC activity in cultured mouse cortical collecting duct cells. *J Membr Biol* 2009 Jan;227(2):77-85.
- (65) Kokko KE, Matsumoto PS, Ling BN, Eaton DC. Effects of prostaglandin E2 on amiloride-blockable Na<sup>+</sup> channels in a distal nephron cell line (A6). *Am J Physiol* 1994 Nov;267(5 Pt 1):C1414-C1425.
- (66) Sakairi Y, Jacobson HR, Noland TD, Breyer MD. Luminal prostaglandin E receptors regulate salt and water transport in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol* 1995 Aug;269(2 Pt 2):F257-F265.
- (67) Pearce D, Soundararajan R, Trimpert C, Kashlan OB, Deen PM, Kohan DE. Collecting duct principal cell transport processes and their regulation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015 Jan 7;10(1):135-46.
- (68) Guan Y, Zhang Y, Breyer RM, Fowler B, Davis L, Hebert RL, et al. Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na<sup>+</sup> absorption by activating the EP1 receptor. *J Clin Invest* 1998 Jul 1;102(1):194-201.
- (69) Ling BN, Kokko KE, Eaton DC. Inhibition of apical Na<sup>+</sup> channels in rabbit cortical collecting tubules by basolateral prostaglandin E2 is modulated by protein kinase C. *J Clin Invest* 1992 Oct;90(4):1328-34.

- (70) Cantiello HF, Patenaude CR, Codina J, Birnbaumer L, Ausiello DA. G alpha i-3 regulates epithelial Na<sup>+</sup> channels by activation of phospholipase A2 and lipoxygenase pathways. *J Biol Chem* 1990 Dec 15;265(35):21624-8.
- (71) Takeuchi K. Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. *World J Gastroenterol* 2012 May 14;18(18):2147-60.
- (72) Karnezis T, Shayan R, Fox S, Achen MG, Stacker SA. The connection between lymphangiogenic signalling and prostaglandin biology: a missing link in the metastatic pathway. *Oncotarget* 2012 Aug;3(8):893-906.
- (73) Chwiesko-Minarowska S, Kowal K, Bielecki M, Kowal-Bielecka O. The role of leukotrienes in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Folia Histochem Cytobiol* 2012;50(2):180-5.
- (74) Kompanowska-Jezierska E, Kuczeriszka M. Cytochrome P-450 metabolites in renal circulation and excretion--interaction with the nitric oxide (NO) system. *J Physiol Pharmacol* 2008 Dec;59 Suppl 9:137-49.
- (75) Spector AA. Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *J Lipid Res* 2009 Apr;50 Suppl:S52-S56.
- (76) Capdevila J, Wang W. Role of cytochrome P450 epoxygenase in regulating renal membrane transport and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013 Mar;22(2):163-9.
- (77) Ussing chamber for Costar filters. 2013.  
Ref Type: Data File <http://users.telenet.be/ep-devices/EPD%20Ussing%20chamber%20-%20Costar%20filters.pdf>
- (78) Loffing J, Schild L. Functional domains of the epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol* 2005 Nov;16(11):3175-81.
- (79) Niisato N, Ohta M, Eaton DC, Marunaka Y. Hypotonic stress upregulates beta- and gamma-ENaC expression through suppression of ERK by inducing MKP-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012 Jul 15;303(2):F240-F252.
- (80) Rozansky DJ, Wang J, Doan N, Purdy T, Faulk T, Bhargava A, et al. Hypotonic induction of SGK1 and Na<sup>+</sup> transport in A6 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002 Jul;283(1):F105-F113.
- (81) Soundararajan R, Lu M, Pearce D. Organization of the ENaC-regulatory machinery. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2012 Jul;47(4):349-59.
- (82) Soundararajan R, Lu M, Pearce D. Organization of the ENaC-regulatory machinery. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2012 Jul;47(4):349-59.
- (83) Soundararajan R, Lu M, Pearce D. Organization of the ENaC-regulatory machinery. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2012 Jul;47(4):349-59.
- (84) Markadieu N, Crutzen R, Blero D, Erneux C, Beauwens R. Hydrogen peroxide and epidermal growth factor activate phosphatidylinositol 3-kinase and increase sodium transport in A6 cell monolayers. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005 Jun;288(6):F1201-F1212.
- (85) Urbach V, Leguen I, O'Kelly I, Harvey BJ. Mechanosensitive calcium entry and mobilization in renal A6 cells. *J Membr Biol* 1999 Mar 1;168(1):29-37.
- (86) Snyder PM. Minireview: regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channel trafficking. *Endocrinology* 2005 Dec;146(12):5079-85.
- (87) Morris RG, Schafer JA. cAMP increases density of ENaC subunits in the apical membrane of MDCK cells in direct proportion to amiloride-sensitive Na<sup>(+)</sup> transport. *J Gen Physiol* 2002 Jul;120(1):71-85.

- (88) Butterworth MB, Edinger RS, Johnson JP, Frizzell RA. Acute ENaC stimulation by cAMP in a kidney cell line is mediated by exocytic insertion from a recycling channel pool. *J Gen Physiol* 2005 Jan;125(1):81-101.
- (89) Segal A, Cucu D, Van DW, Weber WM. Rat ENaC expressed in *Xenopus laevis* oocytes is activated by cAMP and blocked by Ni(2+). *FEBS Lett* 2002 Mar 27;515(1-3):177-83.
- (90) Hiller G, Sundler R. Activation of arachidonate release and cytosolic phospholipase A2 via extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in macrophages stimulated by bacteria or zymosan. *Cell Signal* 1999 Dec;11(12):863-9.
- (91) Borsch-Haubold AG, Ghomashchi F, Pasquet S, Goedert M, Cohen P, Gelb MH, et al. Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in platelets is mediated by multiple stress-activated protein kinase pathways. *Eur J Biochem* 1999 Oct 1;265(1):195-203.
- (92) Miyazaki H, Shiozaki A, Niisato N, Marunaka Y. Physiological significance of hypotonicity-induced regulatory volume decrease: reduction in intracellular Cl<sup>-</sup> concentration acting as an intracellular signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007 May;292(5):F1411-F1417.
- (93) Alexander LD, Alagarsamy S, Douglas JG. Cyclic stretch-induced cPLA2 mediates ERK 1/2 signaling in rabbit proximal tubule cells. *Kidney Int* 2004 Feb;65(2):551-63.
- (94) Bonvalet JP, Pradelles P, Farman N. Segmental synthesis and actions of prostaglandins along the nephron. *Am J Physiol* 1987 Sep;253(3 Pt 2):F377-F387.
- (95) Wei Y, Lin DH, Kemp R, Yaddanapudi GS, Nasjletti A, Falck JR, et al. Arachidonic acid inhibits epithelial Na channel via cytochrome P450 (CYP) epoxygenase-dependent metabolic pathways. *J Gen Physiol* 2004 Dec;124(6):719-27.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Anastasia Polyankina  
Adresse: Ballastkai 1, 24937 Flensburg  
Geburtstag: 19.07.1985  
Geburtsort: Georgiewsk, Russland  
Religion: evangelisch  
Familienstand: geschieden  
Fremdsprachen: Deutsch, Englisch, Russisch

### Schule:

1992–2002 Gesamtschule Stawropol, Abschluss: Abitur, Gesamtnote 1,5

### Studium:

01.08.2002–07.11.2007 Humanmedizin an der „Staatlichen Medizinischen Akademie der Föderalen Agentur für Gesundheitswesen und soziale Entwicklung, Stawropol“  
2007–2008 Lernen der deutschen Sprache. Umzug nach Deutschland.  
22.02.2008 Anrechnung des Studiums in Stawropol für den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Deutschland.  
Seit 27.10.2008 Eingeschrieben an der philosophischen Fakultät an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.  
14.01.2009 Bestehen der Deutschen Sprachprüfung für den Hochschulzugang an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.  
Seit 12.10.2009 Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.  
07–09.10.2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; schriftlicher Teil  
10. –11.12.2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; mündlicher Teil  
Seit 01.07.2015 Assistenzärztin Diako Neurologie Flensburg

**Familie:**

Eltern: Polyankin Alexander, Rentner

Polyankina Natalia, Rentnerin

Geschwister: 2 Brüder

2 Schwestern

**Promotion:**

Experimentelle Arbeit zum Thema: „Rolle von Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) und ihrer Metabolite bei der Aktivierung des epithelialen Natriumkanals (ENaC) beim hypotonischen Schock in A6 Zellen“.

Leitung: Prof. Dr. Markus Bleich, Physiologisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Prof. Dr. Paul Steels, Hasselt University, Belgium.

**Poster/Präsentationen/Vorträge:****Vortrag:**

22.10.2011 Antwerpen, Belgien

"The role of phospholipase-A2 signaling in the enhancement of sodium transport elicited by hypotonicity in A6 cells" A. Polyankina, S. Gruessel, P. Steels, M. Bleich

**Poster:**

26-29.03.2011 Regensburg, Deutschland

"The role of phospholipase A2 signaling in the enhancement of sodium transport elicited by hypotonicity in A6 cells" Polyankina A., Steels P., Bleich M.

09–13.04.2011 Experimental Biology, Washington DC

"The role of the PLA2 signal transduction cascade in the enhancement of sodium transport elicited by hypotonicity studied in A6 cells" P Steels, A. Polyankina, M. Bleich

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. Markus Bleich danken. Ich verdanke ihm jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen. Auch wenn es mal eine schwerere Phase gegeben hat, war er für mich immer da. Ich verdanke ihm darüber hinaus, dass ich meine Doktorarbeit in seinem Labor durchführen konnte und für die finanzielle Unterstützung zur Beschaffung benötigter Reagenzien und Materialien.

Mein größter Dank gilt auch Professor Dr. Paul Steels. Ich danke ihm für die geistige Anregungen und ehrliche und offene Kritik.

Das möchte ich auch Frau Dipl.-Biologin Sandra Grüssel und dem gesamten Team der AG Bleich zurufen. Ich danke für die Ehrlichkeit und die Kollegialität. Besonders möchte ich danken Dr. N. Himmerkus, Herrn Dr. H. Wiese, Herrn T. Stegmann, Herrn G. Ohm, Frau Dr. K. Suffrian, Frau Dr. M. Gutowska und Frau Dr. W. Basse.

Dank gilt natürlich auch meiner Familie. Ich danke meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und immer unterstützend zur Seite standen. Ganz großer Dank geht an meinen Lebensgefährten Ole Jensen und mein Sohn Alexander Jensen für jedwede Unterstützung und den großen Beistand.

Ein herzliches Dankeschön allen meinen lieben Freunden für die Ruhe, Ausdauer und Geduld.